

RBBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analysis

Volume 46 Números 1-4 Ano 2014

Muito além do desrespeito

Far beyond disrespect

Sem reajuste há 20 anos, a Tabela do Sus para exames laboratoriais é uma causa que vai muito além de questões de classe. Com valores congelados desde 1994, pequenos e médios laboratórios privados, principalmente no interior de algumas regiões do País e que, devido à inexistência de laboratórios públicos, fazem o atendimento, sendo responsáveis por até 70% dos exames laboratoriais desses locais, estão fechando as portas, sobrevivendo endividados ou sendo incorporados por entidades de maior porte.

Além de profissionais prejudicados e caos iminente na oferta de vagas, a situação, a longo prazo, pode ter como resultado a cartelização do setor e a taxação de preços em exames, que irão impactar diretamente o bolso do consumidor e do setor público.

Com o objetivo de alertar e combater o problema do setor laboratorial, há dois anos, o movimento Reajuste SUS para Análises Clínicas foi criado por membros da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), em conjunto com outras associações de classe, como Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC), a Associação Brasileira de Bio-medicina, Sindicatos e Conselhos de classe, como Conselho Federal de Farmácia (CFF). Desde então, líderes da campanha têm se reunido, sem êxito, com deputados da Frente Parlamentar da Saúde e com lideranças no Senado em Brasília.

Em todas as tentativas de negociação entre o setor e representantes do Ministério da Saúde, a alegação única para o não reajuste da tabela é de que, agora, os procedimentos laboratoriais são automatizados, portanto muito mais baratos e que, desta forma, os exames prestados aos pacientes do SUS estão muito bem pagos. A questão que se levanta é, ora, se por um lado houve a automação, reduzindo, numa visão unidirecional e simplista, custos, por outro foram criadas novas demandas, como capacitação de pessoal para operar novos equipamentos, realocação de mão de obra, adaptação de sistemas de água, esgotos, sem contar os custos de aquisição ou locação dos equipamentos, insumos, reagentes e kits. Portanto nada mudou. Noventa por cento dos procedimentos laboratoriais tiveram seus valores atuais fixados em 1994, ou seja, há 20 anos. A inflação do período, embora não galopante como anteriormente, existe. Somente dos salários e das tarifas administradas (água, luz, telefone e combustíveis) chega-se a incríveis 500%.

As exigências e qualificações sanitárias, determinadas pela Anvisa, embora importantes e necessárias para a qualificação do setor, muitas vezes não são passíveis de implantação, pois não existe caixa nem rentabilidade para tal.

Portanto só não enxerga quem não quer. Nenhum custo diminuiu.

Para lembrar aos mais desatentos ou desavisados, é fundamental citar que uma dosagem de glicose no sangue, exame fundamental para o diagnóstico de diabetes, por exemplo, ou monitorização de gestante, é remunerada em R\$ 1,85, e estão incluídos nestes valores todos os materiais e equipamentos para a realização do exame, insumos para a coleta, tais como tubo com anticoagulante, seringa, agulha, assepsia, além de tributos exorbitantes, pois, como se sabe, para a área da saúde privada nunca ocorreu nenhum tipo de renúncia fiscal.

É importante citar e deixar bem claro que 70% das decisões clínicas e 90% dos critérios de alta, cura ou de monitorização terapêutica são obtidos através de exames laboratoriais.

Não haverá esmorecimento. Todas as ferramentas possíveis de utilização estão sendo aventadas. Não se pode admitir tamanho desrespeito por uma atividade de importância básica e fundamental para toda a medicina.

Nós não merecemos estes maus tratos, muito menos a população.

Boa leitura.

Irineu Grinberg
Presidente da SBAC

Ética em Pesquisa Científica

Ethics in Scientific Research

O homem atual coloca a ciência como um dos pilares mestres na sustentação de sua fundamentação do real. Por seu sentido e por suas funções, o desenvolvimento científico ocupa um lugar central na construção da realidade social contemporânea.⁽¹⁾

Todavia, o método científico, como é conhecido hoje, foi o resultado direto da obra de inúmeros pensadores, entre os quais, Francis Bacon (1561-1626), Galileu Galilei (1564-1642) e René Descartes (1596-1560). Bacon deu ao conhecimento um caráter mais funcional. O saber científico, segundo ele, deveria ser utilizado em favor do desenvolvimento humano e a natureza deveria ser transformada e modificada em benefício do homem. Galileu Galilei, com seus estudos sobre matemática e física, fundamentou o método científico, através de quatro passos básicos: observação do fenômeno, formulação da hipótese, experimentação e formulação da lei. Descartes, com seu *Discurso do Método*, propôs a instrumentalização da natureza, a explicação matemática e racional dos fenômenos e das coisas e a sua mecanização.⁽²⁾

Com o tempo, o crescimento da ciência e da tecnologia atingiu patamares tais que o método científico não podia ser aplicado sem se discutir a relação entre riscos e benefícios, o que ganhou especial importância em pesquisas médicas onde o estudo com seres vivos [homem] poderia produzir danos irreversíveis ou mesmo a morte. Neste sentido, a introdução de uma ética em pesquisa empenhada em criar normas morais ligadas à proteção de indivíduos envolvidos em estudos científicos passou a ser alicerce da própria pesquisa. De fato, a reflexão ética sobre os estudos, principalmente com seres humanos, é recorrente ao longo da história. Na Idade Média, a dissecação de cadáveres, para estudos de anatomia e fisiologia, era considerada um sacrilégio, e o uso de peças anatômicas era disciplinado, oficialmente, pela igreja. Nesse período, o valor e a certeza do conhecimento residiam no estudo teológico e não na observação natural.^(2,3)

Apesar da secular discussão ética, a história da pesquisa com seres humanos é marcada por situações consideradas abusivas em relação às pessoas envolvidas nos estudos. A literatura relata diversos exemplos de abusos praticados. No século III aC, médicos da escola de Alexandria, utilizando a técnica de vivisseções em criminosos condenados à morte, identificaram o cerebelo, nervos, tendões, próstata, válvulas cardíacas e movimentos pulmonares. André Vesalio (1514-1564) e Ambrósio Paré (1510-1590), na tentativa de salvar o rei de França, Enrique II, ferido em um dos olhos com uma lança, dessecaram o crânio de sentenciados à morte para definirem a trajetória da arma. O médico e cirurgião inglês Charles Maitland (1704-1751) inoculou o vírus da varíola em alguns prisioneiros para conhecer a história natural da doença. Edmund Jenner (1749-1823), também, na Inglaterra, buscando uma vacina contra a varíola, infectou seus filhos e outras crianças da vizinhança, colocando-os em risco e não se preocupando com a sua proteção. A exposição de soldados cubanos a mosquitos da febre amarela contaminados, em 1900, por médicos americanos, foi, da mesma forma, levada a cabo com o intuito de se estudar a história natural da doença. Na Alemanha, até o ano de 1900, foram, igualmente, feitas pesquisas com a inoculação de microrganismos em crianças, gestantes, prisioneiros, doentes terminais e deficientes mentais. Na Segunda Guerra Mundial, a ocupação da China pelo Japão também determinou uma série de abusos para com a população civil chinesa. Essas pessoas foram utilizadas como cobaias em experiências com armas químicas e bacteriológicas para se estudar a reação do corpo humano frente a diferentes substâncias e patógenos. Em Tuskegee, no EUA, foi conduzido um estudo de 40 anos com o objetivo de acompanhar a evolução natural da sífilis sem a

interferência de terapia. Foram utilizados 600 homens negros no total, 400 portadores da doença e 200 saudáveis. Nenhum dos doentes foi submetido a qualquer tratamento. Os alemães, também na Segunda Guerra Mundial, desenvolveram programas de pesquisa com seres humanos ligados à eugenia, resistência corporal ao congelamento, à pressão atmosférica e a gases tóxicos, à eutanásia e à esterilização de doentes com limitações físicas e mentais e a doenças infecciosas.^(1,2,4,5)

Na atualidade, o debate em torno da ética em pesquisa se ampliou, basicamente, em virtude das revelações das experiências médicas nos campos de concentração alemães no século XX. O surgimento da ética em pesquisa é resultado direto da divulgação dessas condutas inaceitáveis na prática científica. A fim de preservar a sua própria integridade e imagem externa, a comunidade de cientistas não pode ser indiferente à ocorrência de erros em seu cerne. Ao contrário, é fundamental que os equívocos e excessos sejam detectados, identificados, avaliados em termos de gravidade, corrigidos e que, acima de tudo, não permaneçam impunes. De fato, o sentido da impunidade é um claro convite à ausência de ética e ao não respeito às boas práticas de pesquisa científica. Impõe-se, dessa forma, que a comunidade de cientistas saiba reagir à conduta censurável, não apenas com o objetivo de condenar eventuais responsáveis, mas, sobretudo, visando evitar que erros semelhantes venham a ser repetidos no futuro. Importa considerar que, do respeito à ética, depende toda a construção válida do conhecimento científico.^(2,3,6)

REFERÊNCIAS

1. Lima SF, Malacarne, V. Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos: Reflexões a partir das Experiências da UNIOESTE. Educação Temática Digital. 2009;11(2):175-205.
2. Kottow M. História da Ética em Pesquisa com Seres Humanos. In: Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F (Orgs). Ética em Pesquisa: Temas Globais. Brasília: Editora UNB; 2008. p. 53-83.
3. Kipper DJ. Breve História da Ética em Pesquisa. Revista da AMRIGS. 2010;54(2):224-8.
4. Araújo LZS. Breve História da Bioética: Da Ética em Pesquisa à Bioética, In: Rego S, Palácios M (Orgs): Comitês de Ética em Pesquisa: Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2012. p. 71-84.
5. Vieira S. Ética e Metodologia na Pesquisa Médica. Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil. 2005;5(2).
6. Oliveira LA. Ética em Investigação Científica: Guia de Boas Práticas com Estudos de Caso. Lisboa: Lidel Edições Técnicas; 2013. 187pp.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da RBAC

Principais mudanças na V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose

Main changes in V Brazilian Guidelines of Dyslipidemias and Atherosclerosis Prevention

Mauren Isfer Anghebem-Oliveira*¹

Tania Leme Rocha Martinez²

Marileia Scartezini³

Resumo

A principal causa de morte na população mundial continua sendo as doenças cardiovasculares, frequentemente, associadas às dislipidemias. Diagnosticar e tratar indivíduos com alterações lipídicas nem sempre é simples, mas o controle das dislipidemias, em particular a redução nas concentrações do colesterol da LDL (lipoproteína de baixa densidade), tem se mostrado eficaz na diminuição de eventos cardiovasculares e morte. Frente a um panorama epidêmico, um comitê de especialistas publicou, em outubro de 2013, a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. O documento traz algumas modificações em relação às edições anteriores, mostrando a importância da estratificação do risco individual e do alcance da meta terapêutica. Sob o ponto de vista laboratorial, uma nova abordagem em relação aos valores de referência do perfil lipídico foi inserida e, a partir destes novos direcionamentos, especial atenção deve ser dada para valores de Colesterol Total (CT) ≥ 310 mg/dL (para adultos) ou CT ≥ 230 mg/dL [entre os 2 e os 19 anos], os quais podem indicar a presença de Hipercolesterolemia Familiar.

Palavras-chave

Diretriz; Dislipidemias; Perfil lipídico; Aterosclerose

INTRODUÇÃO

Altas concentrações de lipoproteínas plasmáticas, em especial a lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL), são as principais responsáveis pela formação da placa de ateroma e desenvolvimento da aterosclerose.⁽¹⁾ As doenças cardiovasculares, manifestações clínicas da aterosclerose, continuam sendo a principal causa de mortes no mundo, representando cerca de 30% de todos os óbitos e alvo de estudos de diversas áreas da saúde.⁽²⁾

A Sociedade Brasileira da Cardiologia, em interação com outras especialidades, tais como medicina laboratorial, endocrinologia, pediatria, nutrologia, geriatria e gerontologia, nefrologia e ginecologia e obstetrícia, além de sociedades afins, como a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), vem, ao longo dos anos, elaborando e atualizando diretrizes que tratam sobre as dislipidemias e a prevenção da aterosclerose. Em outubro de 2013, a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose foi publicada e traz algumas modificações que visam melhorar a avaliação dos pacientes em risco de desenvolver uma doença cardiovascular. O novo documento revisa o metabolismo dos lipídios, a aterogênese e a classificação das dislipidemias,

adota algoritmos para estratificação do risco cardiovascular do paciente, aborda sobre os tratamentos disponíveis para as dislipidemias, discute sobre as dislipidemias secundárias e em grupos especiais, como idosos, crianças e adolescentes, e recomenda novos valores de referência para o perfil lipídico.⁽³⁾

À luz dessa nova Diretriz, as autoras se propõem a destacar, através de uma abordagem objetiva, as principais atualizações e alterações, enfocando o laboratório clínico.

PARÂMETROS LABORATORIAIS

Perfil lipídico

A determinação laboratorial do perfil lipídico para avaliar o risco cardiovascular (CV), através da análise do colesterol total (CT) e do colesterol da LDL (LDL-C), é mantida e recomendada pela nova Diretriz.

Em relação à fase pré-analítica, existe uma nova abordagem sobre o jejum. Diferentemente das edições anteriores, a V Diretriz considera que não há necessidade de jejum prévio para as determinações isoladas do CT, apo B, apo A-I e colesterol da HDL (HDL-C). Sob o ponto de vista metodológico, esses parâmetros não sofrem influência significativa com a

¹Farmacêutica-bioquímica; Professora Adjunta de Bioquímica Clínica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR.

²Médica Colaboradora do Incor/HC/Femusp; Professora Livre Docente em Medicina pela Unifesp-EPM, São Paulo, SP.

³Farmacêutica-bioquímica; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

ingestão de alimentos.⁽⁴⁾ É importante ressaltar que, para avaliação da glicemia e de outros parâmetros laboratoriais, é necessário observar o tempo de jejum. Nesse caso, o jejum recomendado deve ser respeitado, mesmo quando houver a solicitação de outros exames, além do CT, apo B, apo A-I e HDL-C.⁽⁵⁾

O jejum de 12 horas é obrigatório para análise das concentrações de triglicérides (TG), como, também, para o cálculo do LDL-C, pela fórmula de Friedewald, que inclui o CT e HDL-C. As demais recomendações pré-analíticas, em relação ao perfil lipídico, não foram alteradas:

1) Manter dieta habitual, estado metabólico e peso estáveis por, pelo menos, duas semanas antes da realização do exame;

2) Evitar ingestão de álcool, nas 72 horas que antecedem a coleta de sangue;

3) Evitar atividade física vigorosa, nas 24 horas que antecedem a coleta de sangue.

A determinação do perfil lipídico ainda sofre a influência da variabilidade biológica, pré-analítica e analítica. A variação entre duas dosagens, no mesmo indivíduo, ou variação intra-individual, pode chegar a 10%, para o CT, e mais de 20%, para os TG, particularmente nos indivíduos que apresentam hipertrigliceridemia. Além da variação analítica, a alimentação, atividade física e a variação sazonal também influenciam. Concentrações de CT e LDL-C podem aumentar durante os meses de frio, em virtude das mudanças no estilo de vida e na dieta.⁽⁶⁾ Pacientes com alterações no perfil lipídico devem repetir o exame, entre uma semana e dois meses após a coleta da primeira amostra, a fim de reduzir a variabilidade entre os ensaios e aumentar a precisão diagnóstica.⁽⁷⁾

Os valores referenciais do perfil lipídico, para adultos com mais de 20 anos, são apresentados na Tabela 1, e, para a faixa etária entre 2 e 19 anos, estão apresentados na Tabela 2. Os valores desejáveis para o CT permanecem < 200 mg/dL e para TG < 150 mg/dL. Houve uma pequena modificação para LDL-C, HDL-C e Colesterol não-HDL e a segregação dos valores desde desejável, passando pelo limítrofe e alto, até o muito alto.

Os valores preconizados, para a faixa etária entre 2 e 19 anos, baseiam-se em grau de recomendação IIa (não há consenso, mas há aceitação da maioria dos grupos de estudo) e nível de evidência B (a partir de um único estudo clínico controlado e aleatorizado, bem como de estudos clínicos não aleatorizados e estudos observacionais bem desenhados).

As evidências que confirmam que a diminuição do LDL-C reduz, proporcionalmente, as doenças cardiovasculares são consistentes.⁽⁸⁾ Desta forma, em consonância com diretrizes internacionais, o LDL-C continua sendo indicado como alvo primário terapêutico nas dislipidemias.⁽⁹⁾

O Colesterol não-HDL, parâmetro que foi destacado como meta terapêutica, a partir da IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia, é indicado, na V Diretriz, para estimar o número de partículas aterogênicas no plasma: LDL + VLDL [lipoproteína de densidade muito baixa/*Very Low Density Lipoprotein*]

Tabela 1 - Valores referenciais do perfil lipídico para adultos com mais de 20 anos.

Lípides	Valores (mg/dL)	Categoria
Colesterol total	< 200	Desejável
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-Colesterol	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-Colesterol	> 60	Desejável
	< 40	Baixo
Triglicérides	< 150	Desejável
	150-200	Limítrofe
	200-449	Alto
	≥ 500	Muito alto
Colesterol não-HDL	< 130	Ótimo
	130-159	Desejável
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto

Tabela 2 - Valores referenciais do perfil lipídico para a faixa etária entre 2 e 19 anos

Lípides	Valores (mg/dL)		
	Desejáveis	Limítrofes	Elevados
CT	< 150	150-169	≥ 170
LDL-C	< 100	100-129	≥ 130
HDL-C	≥ 45		
TG	< 100	100-120	≥ 130

+ lipoproteínas remanescentes como a IDL [lipoproteína de densidade intermediária/*Intermediate Density Lipoprotein*], quando presentes. O Colesterol não-HDL é calculado subtraindo-se o HDL-C do CT [Colesterol não-HDL = CT - HDL-C], fornecendo uma estimativa de risco mais adequada, em comparação ao LDL-C, em situações onde o uso da fórmula de Friedewald é limitado. Pacientes com valores de TG ≥ 400 mg/dL, especialmente naqueles em que a hipertrigliceridemia está acompanhada de diabetes, síndrome metabólica e doença renal crônica seriam favorecidos com a análise do Colesterol não-HDL.⁽³⁾

Valores aumentados de Colesterol não-HDL podem indicar indivíduos com maior risco de doença cardiovascular, independentemente dos valores de LDL-C. Quando comparado à apo B, o Colesterol não-HDL parece ser uma opção mais econômica e metodologicamente mais bem estabelecida.⁽¹⁰⁾ A recomendação da nova Diretriz é que o Colesterol não-HDL seja utilizado como meta terapêutica secundária.

Apolipoproteínas, Lipoproteína(a) e relações entre lipoproteínas

A apo B reflete a quantidade de partículas aterogênicas no plasma, em especial a LDL, enquanto que a apo A-I reflete a quantidade de HDL circulante.⁽¹¹⁾

A IV Diretriz não recomendava a determinação das apo B, A-I e da Lipoproteína(a), na prática clínica de rotina. Entendia-se que o custo das análises e a ausência de informação adicional clinicamente relevante, na maioria dos indivíduos, limitavam sua utilização. Atualmente, a determinação laboratorial das apo B e da apo A-I é realizada, através de métodos imunoquímicos de fácil execução, em automação convencional, com excelente desempenho analítico e com a vantagem de não haver necessidade de jejum. Embora a V Diretriz reconheça que o papel da apo B na predição de risco, ou mesmo como um possível alvo de tratamento, possa ser melhor do que o LDL-C, sua determinação não está incluída nos algoritmos de cálculo de risco cardiovascular e não tem alvo de tratamento predefinido.

A Lipoproteína(a) [Lp(a)] é um fator de risco para aterosclerose e para doenças cardiovasculares devido às suas características pro-aterogênicas e pro-coagulantes.⁽¹²⁾ Suas concentrações são, em grande parte, determinadas geneticamente. Existem vários métodos para determinação da Lp(a), mas, ainda, é necessário padronização. Sua dosagem pode ser considerada em pessoas com alto risco para doença cardiovascular ou com forte história familiar de doença prematura aterotrombótica. No entanto, a nova Diretriz não recomenda sua utilização na rotina para avaliar risco CV na população.

As relações entre lipoproteínas aterogênicas e antiaterogênicas (apo B/apo A-I, CT/HDL-C e Colesterol não-HDL/HDL-C) podem ser úteis para se conhecer o equilíbrio entre o colesterol pró e antiaterogênico (HDL-C e LDL-C, respectivamente) no auxílio da avaliação do risco CV, porém, não é útil para o diagnóstico das dislipidemias ou como alvos de tratamento.⁽¹³⁾

Eletroforese de lipoproteínas (lipidograma)

A eletroforese de lipoproteínas ou lipidograma só é recomendada em situações especiais quando há suspeita de Dislipidemia tipo III de Fredrickson, onde não há diferenciação entre as curvas da pré-beta e betalipoproteínas, ou seja, na ocorrência da banda "Beta-Larga". Nos demais casos, a eletroforese de lipoproteínas não auxilia na tomada de decisões clínicas.⁽⁷⁾

Tamanho das partículas de lipoproteínas - LDL pequena e densa

As lipoproteínas constituem uma classe heterogênea de partículas e numerosas evidências sugerem que as diferentes subclasses de LDL e HDL apresentam diferentes riscos para aterosclerose. A LDL pequena e densa é mais aterogênica do que a lipoproteína LDL e está presente todas as vezes que as concentrações de TG forem superiores a 150 mg/dL, o que é muito frequente em pacientes diabéticos.⁽⁷⁾

Genotipagem

O rastreamento genético, em famílias com Hipercolesterolemia Familiar (HF), é recomendado pela V Diretriz, tanto

por mapeamento genético laboratorial quanto através dos critérios de diagnóstico de HF, baseados na I Diretriz de Hipercolesterolemia Familiar.⁽¹⁴⁾

Como as dislipidemias primárias têm um componente genético, vários genes envolvidos com o metabolismo de lipídios e lipoproteínas têm sido associados às doenças cardiovasculares. A genotipagem ainda não é realidade para a rotina da prática clínica, mas a V Diretriz aponta para a possibilidade de pesquisas de genes associados à HF e para o diagnóstico de algumas hiperlipidemias primárias, bem como a genotipagem da alipoproteína E (apo E).⁽¹⁵⁾

Recentemente, a identificação de alguns polimorfismos no gene da proteína PCSK9 (proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9) foi associada com hipercolesterolemia, que ocorre em menos de 2% dos pacientes com diagnóstico clínico para HF, no Reino Unido,⁽¹⁶⁾ ou com a diminuição do colesterol no plasma, que está associada com o perfil lipídico de baixo risco para a Doença Arterial Coronariana (DAC) em homens, também, saudáveis do Reino Unido.⁽¹⁷⁾

A identificação e a caracterização da PCSK9 introduziram novos conhecimentos ao metabolismo do colesterol. PCSK9 é uma protease expressa, predominantemente, pelo fígado, intestino e rins, e capaz de inibir a reciclagem do receptor do LDL (LDL-R) de volta à superfície celular, resultando em menor número de receptores e aumento dos níveis plasmáticos de LDL.⁽¹⁸⁾ A inibição da PCSK9, outro potencial foco na terapêutica da hipercolesterolemia, bloqueia a degradação do LDL-R, aumentando a remoção do LDL circulante.⁽¹⁹⁾

O papel do laboratório clínico fica ressaltado até o presente item. A seguir, serão descritos os procedimentos do clínico frente ao seu paciente.

CLASSIFICAÇÃO DAS DISLIPIDEMIAS

A classificação das dislipidemias se manteve igual à diretriz anterior. As dislipidemias podem ser primárias ou secundárias. As causas secundárias mais comuns são: obesidade, dieta e estilo de vida, uso de alguns fármacos como corticoides⁽²⁰⁾ e isotretinoína,^(21,22) doenças metabólicas, como diabetes⁽²³⁾ e hipotireoidismo,⁽²⁴⁾ doenças autoimunes⁽²⁵⁾ e doença renal.⁽²⁶⁾

As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas, fenotipicamente, por meio de análises bioquímicas e genotipicamente. Por genotipagem, as dislipidemias primárias se dividem em monogênicas, quando apenas um gene apresenta mutações, e poligênicas, causadas por múltiplas mutações em mais de um gene. A classificação fenotípica ou bioquímica considera os valores de CT, LDL-C, TG e HDL-C e compreende quatro tipos principais, bem definidos:

1) Hipercolesterolemia isolada: elevação isolada do LDL-C (≥ 160 mg/dL);

2) Hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TG (≥ 150 mg/dL), com consequente aumento de VLDL, IDL e quilomícrons. Para esta dislipidemia, o valor do colesterol não-HDL pode ser usado como indicador de diagnóstico e meta terapêutica, uma vez que a estimativa do LDL-C pela fórmula de Friedewald estará prejudicada;

3) Hiperlipidemia mista: valores aumentados de LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL). O colesterol não-HDL também poderá ser usado como indicador e meta terapêutica. Nos casos em que TG ≥ 400 mg/dL, o cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald é inadequado, devendo-se, então, considerar a hiperlipidemia mista quando CT ≥ 200 mg/dL;

4) HDL-C baixo: redução do HDL-C (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL-C ou de TG.

Dislipidemias graves

Afastadas as causas secundárias, anteriormente citadas, deve-se considerar uma dislipidemia de etiologia genética e de caráter familiar quando as concentrações de LDL-C e TG forem, isoladamente ou associadas, maiores que 190 mg/dL e maiores que 800 mg/dL, respectivamente. Diante deste quadro, é recomendado que familiares próximos [adultos e crianças] sejam rastreados..

A HF deve ser cogitada sempre que LDL-C ≥ 190 mg/dL. Os critérios diagnósticos, a conduta e as possibilidades terapêuticas para esta grave dislipidemia estão disponíveis na I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar.⁽¹⁴⁾

Em reunião conjunta, a Sociedade Brasileira de Cardiologia – Departamento de Aterosclerose (SBC/DA), a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e a Associação Brasileira de Biomedicina (ABBM) firmaram um documento sugerindo que os laudos laboratoriais referentes aos perfis lipídicos tenham uniformidade em todo o Brasil no que se refere aos valores de referência e, principalmente, ao alerta indicativo para o diagnóstico de HF. Valores de CT ≥ 310 mg/dL (para adultos) ou CT ≥ 230 mg/dL (entre os 2 e os 19 anos) podem ser indicativos de HF, excluídas as dislipidemias secundárias, conforme o Consenso Europeu sobre HF.⁽²⁷⁾

A hipertrigliceridemia isolada é caracterizada por concentrações de TG muito elevadas. Quando TG > 1.000 mg/dL, estes valores representam risco importante de pancreatite aguda e justificam medidas de intervenção imediatas. Afastadas as causas secundárias, é fundamental determinar a origem ou classe de TG, se exógena (presença de quilomícron) ou endógena (presença de VLDL), pois isto irá determinar o tipo de dieta, isto é, restrição de gorduras e/ou de carboidratos, caso se evidencie aumento das duas frações.

Por fim, ainda no caso de uma associação de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, tem-se uma dislipidemia mista, que deve ser tratada com restrição alimentar e terapia medicamentosa associada.

ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO

A estimativa de risco de doença aterosclerótica resulta do somatório do risco associado a cada um dos fatores condicionantes mais a potenciação causada por sinergismos entre alguns desses fatores. A identificação do risco global tem sido obtida através do uso de algoritmos que estimam o Escore de Risco (ER) do paciente.

A IV Diretriz indicava o Escore de Risco de Framingham (ERF), que estima a probabilidade de ocorrer infarto do miocárdio ou morte por doença coronária, no período de 10 anos, em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica.⁽²⁸⁾ A nova Diretriz elucida, além do ERF, o Escore de Risco de Reynolds, o Escore de Risco Global e o Escore de Risco pelo Tempo de Vida, mas optou por adotar o ER Global para avaliação do risco, em 10 anos, e o ER pelo Tempo de Vida, como opção para os indivíduos acima de 45 anos, considerados de baixo risco ou risco intermediário, em 10 anos. A combinação de um escore de curto prazo com outro de longo prazo permite melhor estimativa de risco.

O ER de Reynolds, que inclui a proteína C reativa e o antecedente familiar de doença coronariana prematura, estima a probabilidade de infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE), morte e revascularização do miocárdio, em 10 anos.⁽²⁹⁾ O ER Global estima o risco de infarto do miocárdio, AVE, insuficiência vascular periférica ou insuficiência cardíaca, em 10 anos.⁽³⁰⁾ Já o ER pelo Tempo de Vida, utilizado a partir dos 45 anos, avalia a probabilidade de um indivíduo, a partir dessa idade, apresentar um evento isquêmico.⁽³¹⁾

A V Diretriz recomenda a estratificação do risco considerando três etapas:

- 1) A determinação da presença de doença aterosclerótica significativa ou de seus equivalentes;
- 2) A utilização dos escores de predição do risco;
- 3) A reclassificação do risco predito pela presença de fatores agravantes do risco. Seguindo as três etapas, chega-se a um risco absoluto final, onde são considerados:
 - Baixo risco: homens e mulheres com menos de 5% de risco absoluto em 10 anos;
 - Risco intermediário: mulheres com $\geq 5\%$ e $\leq 10\%$ e homens com $\geq 5\%$ e $\leq 20\%$ de risco absoluto em 10 anos;
 - Alto risco: mulheres com $> 10\%$ e homens com $> 20\%$ de risco absoluto em 10 anos.

Com base no risco cardiovascular global, as metas lipídicas sugeridas na nova diretriz são apresentadas na Tabela 3.

A redução dos valores para LDL-C proposta pelo documento é diferenciada para cada categoria de risco por meio do ER Global, onde vários fatores de risco são considerados (sexo, idade, quantidades de fatores de risco presentes, como histórico familiar de doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão, tabagismo, diabetes, obesidade, sedentarismo). A meta terapêutica será traçada com base no risco global. A Figura 1 ilustra as modificações

Tabela 3 - Metas lipídicas de acordo com o risco cardiovascular

Nível de Risco	Meta primária LDL-C	Meta secundária Colesterol não-HDL
Alto	LDL-C < 70 mg/dL	Col. não-HDL < 100 mg/dL
Intermediário	LDL-C < 100 mg/dL	Col. não-HDL < 130 mg/dL
Baixo*	Meta individualizada	Meta individualizada

* Pacientes de baixo risco CV deverão receber orientação individualizada, com as metas estabelecidas pelos valores referenciais do perfil lipídico (apresentados na Tabela 1) e foco no controle e na prevenção dos demais fatores de risco CV.

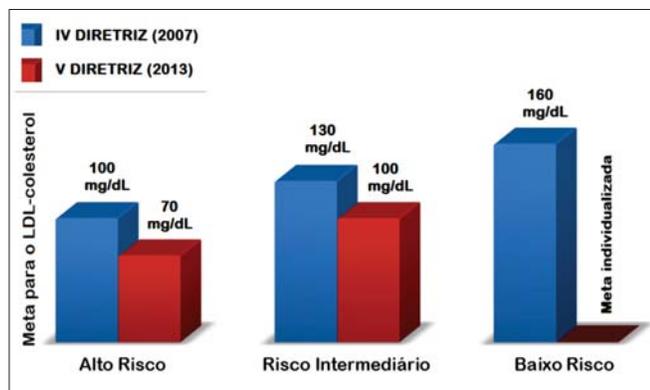


Figura 1. Comparação entre as metas para o LDL-Colesterol preconizadas pelas IV e V Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, em relação ao risco cardiovascular do paciente.

em relação aos valores de LDL-C, de acordo com o risco cardiovascular do paciente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose traz alguns novos enfoques sobre o assunto, com o objetivo de identificar pacientes com risco aumentado para doenças cardiovasculares, diagnosticar e tratar as dislipidemias de forma mais eficiente e reduzir os eventos e a mortalidade cardiovascular.

Retomando a atenção ao ponto de vista laboratorial, finalizamos com algumas considerações deste novo documento que merecem destaque:

1) Para a determinação laboratorial de TG e LDL-C estimado pela fórmula de Friedewald é obrigatório um jejum de 12 horas;

2) Para a realização do perfil lipídico é indicado manter dieta habitual, estado metabólico e peso estáveis por pelo menos duas semanas antes da realização do exame;

3) Evitar ingestão de álcool nas 72 horas e atividade física vigorosa nas 24 horas que antecedem a coleta de sangue;

4) Especial atenção deve ser dada para valores de CT \geq 310 mg/dL (para adultos) ou CT \geq 230 mg/dL (entre os 2 e os 19 anos) podem ser indicativos de Hipercolesterolemia Familiar.

Abstract

Cardiovascular diseases often associated with dyslipidemia remain the world's leading causes of death. Diagnosis and treatment of patients with lipid abnormalities is challenging, but controlling dyslipidemia, in particular reducing LDL cholesterol [low density lipoprotein] concentrations has proven effective in reducing cardiovascular events and death. Due to the epidemic scenery, an expert committee published in October 2013 the V Brazilian Guidelines for Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention. The document contains some changes from previous editions, highlighting the magnitude of individual risk stratification and the therapeutic goal. Under the laboratory standpoint, a new approach to the reference values of the lipid profile was inserted and special attention should be given to Total Cholesterol [TC] values \geq 310 mg/dL [for adults] or TC \geq 230 mg/dL [between 2 and 19], which may indicate the presence of Familial Hypercholesterolemia.

Keywords

Guidelines; Dyslipidemias; Lipid profile; Atherosclerosis

REFERÊNCIAS

- Uchida Y, Maezawa Y, Hiruta N, Shimoyama E, Kawai S. Localization of oxidized low-density lipoprotein and its relation to plaque morphology in human coronary artery. Plos One. 2013; 8(2):e55188.
- World Health Organization. The top 10 causes of death [database on the Internet]. 2013. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
- Xavier HTIMC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, Fonseca FA, dos Santos JE, Santos RD, Bertolami MC, Faludi AA, Martinez TLR, Diament J, Guimarães A, Forti NA, Moriguchi E, Chagas ACP, Coelho OR, Ramires JAF. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol. 2013;101 Suppl 1:1-22.
- Langsted A, Nordestgaard BG. Nonfasting lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in individuals with and without diabetes: 58 434 individuals from the Copenhagen General Population Study. Clin Chem. 2011;57(3):482-9.
- Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M. Standardization of collection requirements for fasting samples: For the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Clin Chim Acta. 2013 Nov 20. pii: S0009-8981(13)00446-4.
- Bardini G, Dicembrini I, Rotella CM, Giannini S. Lipids seasonal variability in type 2 diabetes. Metabolism. 2012;61(12): 1674-7
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afíune Neto A, Souza AD, et al; Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. Arq Bras Cardiol. 2007;88 Suppl 1:2-19. [Article in Portuguese]
- Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. Lancet. 2010;376 (9753):1670-81.
- Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Eur Heart J. 2011;32(14):1769-818.
- Rana JS, Boekholdt SM, Kastelein JJ, Shah PK. The role of non-HDL cholesterol in risk stratification for coronary artery disease. Curr Atheroscler Rep. 2012;14(2):130-4.

11. Frohlich J, Al-Sarraf A. Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2013;22(1):16-8.
12. Cai A, Li L, Zhang Y, Mo Y, Mai W, Zhou Y. Lipoprotein(a): Lipoprotein(a): a promising marker for residual cardiovascular risk assessment. *Dis Markers*. 2013;35(5):551-9.
13. Jung CH, Hwang JY, Shin MS, Yu JH, Kim EH, Bae SJ, et al. Association of apolipoprotein b/apolipoprotein A1 ratio and coronary artery stenosis and plaques detected by multi-detector computed tomography in healthy population. *J Korean Med Sci*. 2013;28(5):709-16.
14. Santos RD, Gagliardi AC, Xavier HT, Casella Filho A, Araújo DB, Cesena FY, et al. First Brazilian Guidelines for Familial Hypercholesterolemia. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(2 Suppl 2):1-28. [Article in Portuguese].
15. Kofler BM, Miles EA, Curtis P, Armah CK, Tricon S, Grew J, et al. Apolipoprotein E genotype and the cardiovascular disease risk phenotype: impact of sex and adiposity (the FINGEN study). *Atherosclerosis*. 2012;221(2):467-70.
16. Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, Maplebeck S, Cooper JA, Soutar AK, et al; Simon Broome Familial Hyperlipidaemia Register Group and Scientific Steering Committee. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*. 2006 Dec;43(12):943-9. Erratum in: *J Med Genet*. 2009 Dec;46(12):861; *J Med Genet*. 2010;47(12):862.
17. Scartezini M, Hubbart C, Whittall RA, Cooper JA, Neil AH, Humphries SE. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113(11):435-41.
18. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S172-7.
19. Steinberg D, Witztum JL. Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9546-7.
20. Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013;9(1):30.
21. Zane LT, Leyden WA, Marqueling AL, Manos MM. A population-based analysis of laboratory abnormalities during isotretinoin therapy for acne vulgaris. *Arch Dermatol*. 2006;142(8):1016-22.
22. Vieira AS, Beijamini V, Melchior AC. The effect of isotretinoin on triglycerides and liver aminotransferases. *An Bras Dermatol*. 2012;87(3):382-7.
23. Mullugeta Y, Chawla R, Kebede T, Worku Y. Dyslipidemia associated with poor glycemic control in type 2 diabetes mellitus and the protective effect of metformin supplementation. *Indian J Clin Biochem*. 2012;27(4):363-9.
24. Asranna A, Taneja RS, Kulshreshtha B. Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine on lipid profile. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(Suppl 2):S347-9.
25. Kedar E, Gardner GC. Lipid-associated rheumatologic syndromes. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013;39(2):481-93.
26. Chen SC, Hung CC, Kuo MC, Lee JJ, Chiu YW, Chang JM, et al. Association of dyslipidemia with renal outcomes in chronic kidney disease. *Plos One*. 2013;8(2):e55643.
27. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478-90.
28. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
29. Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA*. 2007 Feb 14;297(6):611-9. Erratum in *JAMA*. 2007 Apr 4;297(13):1433.
30. D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117(6):743-53.
31. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, et al. Lifetime risks of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2012; 366(4):321-9.

Correspondência

Mauren Isfer Anghebem-Oliveira*Pontifícia Universidade Católica do Paraná.**Avenida Imaculada Conceição – Prado Velho**80245-901 – Curitiba, PR**Telefone: (41) 32712167, Ramal: 2167**mauren.oliveira@pucpr.br*

Avaliação laboratorial das interleucinas: prognóstico e monitoramento de diferentes doenças humanas

Laboratory evaluation of interleukins: prediction and follow-up of different human diseases

Luciana Montes Rezende¹
Aender Tiago dos Reis¹
Marcelo Fernandes da Silva²

Resumo

Em laboratórios de análises clínicas, interleucinas (IL) são quantificadas por diferentes metodologias como as variantes dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA, EIA MEIA), quimioluminescência (CLIA) e eletroquimioluminescência (ECL). No entanto, no Brasil, a quantificação das IL está restrita a poucos laboratórios clínicos, uma vez que o custo dos exames é alto em comparação a outros comumente utilizados. Sabe-se que a detecção de algumas IL pode antecipar o prognóstico e a gravidade das patologias, possibilitando a prescrição de tratamentos eficazes, evitando o agravamento do quadro clínico dos pacientes. Em doenças de desenvolvimento crônico, pode-se prever desde o grau lesão tissular até a resolução dos quadros. O objetivo deste trabalho foi apresentar a utilização das dosagens de interleucinas no prognóstico e monitoramento de diferentes doenças humanas, através das metodologias de ELISA, CLIA e ECL.

Palavras-chave

Interleucinas; Diagnóstico; Doenças

INTRODUÇÃO

A imunologia básica e clínica sofreu uma verdadeira revolução a partir da descoberta das interleucinas, porém a medicina diagnóstica moderna ainda não usufruiu adequadamente deste conhecimento. As interleucinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, responsáveis pela comunicação celular por meio da emissão de sinais durante diferentes fases e mecanismos da imunidade. Atuam como reguladores humorais em pequenas concentrações, podendo ser secretadas ou expressas em membranas celulares (em células da imunidade inata e adquirida) ou, ainda, armazenadas na matriz extracelular.^(1,2)

Exposições a agentes químicos ou infecciosos ativam uma cascata de reações, culminando em respostas imunológicas de alta complexidade e especificidade que são amplamente moduladas por interleucinas. Participam desse processo células dendríticas, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T auxiliares (Th1, Th2, Th3, Th17 e Treg), linfócitos T citotóxicos, dentre outras células. A proliferação de linhagens específicas de linfócitos T auxiliares determina o tipo de resposta desenvolvida, interleucinas produzidas e a progressão da doença.^(3,4)

Cada subpopulação de linfócitos T auxiliares produz um perfil de interleucinas distinto que promove uma rápida resolução do processo infeccioso ou permite que o mesmo

evolua por um longo período, acarretando maior destruição tecidual, inflamação e necrose.⁽¹⁾

Respostas envolvendo a subpopulação Th1 são observadas, principalmente, em doenças bacterianas, e nelas ocorre maior produção de IFN- γ , IL-2, e IL-12.^(1,3,4) O aumento da proliferação de linfócitos Th2 em doenças parasitárias e reações alérgicas, sendo produzidas neste processo, estão relacionadas notadamente à IL-4 e IL-5.⁽¹⁾

Estudos recentes comprovam a existência de outras subpopulações de linfócitos T auxiliares: Th17, Treg e Th3. Linfócitos Th17 são induzidos precocemente na resposta imune adaptativa contra bactérias e são responsáveis pela estimulação da resposta de neutrófilos para a eliminação desses organismos, pela produção de IL-6, IL-17, IL-23 e TGF- β . Já os linfócitos Treg são células T reguladoras adaptativas que, através da produção de IL-10 e TGF- β , inibem a ação de outras células T, regulando a resposta imune e mantendo a autotolerância. Diferentemente das outras subpopulações, as células Th3 são responsáveis pela proteção de mucosas, onde são encontradas secretando IL-4, IL-10 e TGF- β . Sua ausência está relacionada a doenças inflamatórias e autoimunes intestinais.^(3,4)

Em decorrência da melhoria na tecnologia diagnóstica e do conhecimento sobre a imunologia básica e média, houve um aumento no número de pesquisas que relacionam os níveis séricos de determinadas interleucinas com a gravidade

¹Graduando em Biomedicina – Universidade de Uberaba – UNIUBE – Uberaba, MG.

²Doutor em Imunologia Básica e Aplicada – Docente da Universidade de Uberaba – UNIUBE – Uberaba, MG e Universidade Estadual de Santa Cruz – Uesc – Salobrinho, Ilhéus, BA.

ou remissão de doenças humanas. O método imunoenzimático (ELISA) e suas variações técnicas tem sido o mais utilizado,^(5,7) seguido pela metodologia automatizada de quimioluminescência (CLIA).^(8,9)

Como critério de inclusão, foram consideradas as publicações como as de Costa e colaboradores,⁽¹⁰⁾ que realizaram dosagens séricas de IL-1 β em pacientes com hanseníase, obtendo níveis elevados dessa IL naqueles indivíduos em fase aguda da doença, que não haviam sido submetidos a tratamento. Esses indivíduos foram medicados e os níveis de IL-1 β controlados, não havendo diminuição durante a terapêutica. Os autores sugerem que a dosagem de IL-1 β deva ser considerada como um indicador da resposta imune na hanseníase e que os valores elevados da interleucina, mesmo durante o tratamento, indicam que partículas antigênicas são capazes de gerar estímulos persistentes para a produção de IL-1 β . Foram incluídas, ainda, aquelas publicações como a de Vieira e colaboradores,⁽¹¹⁾ que demonstraram o aumento dos níveis de IL-10 nas secreções nasofaríngeas, e de IL-6 no soro, em crianças menores de 3 meses de idade, que apresentavam doença respiratória pelo vírus sincicial (VSR). Os autores observaram que as crianças que exibiam níveis elevados dessa IL à admissão hospitalar apresentavam maior gravidade do quadro respiratório. Segundo eles, elevados níveis de IL-6 parecem estar significativamente associados ao maior tempo de oxigenoterapia e ao prolongamento da internação. Esses autores concluíram que IL-10 e IL-6 são marcadores adequados para determinar a gravidade da doença por VSR no trato respiratório de crianças menores de 3 meses

Devido à contribuição que estas informações podem ter na formação e na atualização dos profissionais envolvidos no diagnóstico das principais doenças humanas, o objetivo do presente trabalho é atualizar a discussão sobre a aplicação clínico-laboratorial da dosagem de IL no prognóstico e monitoramento de diferentes doenças humanas.

Os autores do presente trabalho realizaram uma revisão da literatura, incluindo publicações nas quais a quantificação de interleucinas séricas esteve relacionada a doenças de diferentes etiologias, tais como parasitárias, bacterianas, virais, autoimunes e inflamatórias (Tabela 1). Foram encontrados 26 trabalhos, em três diferentes bases de dados científicas, relacionados no portal Capes.

INTERLEUCINAS E PARASITOSE

Doença de Chagas

Diferentes doenças de etiologia parasitária podem apresentar desenvolvimento crônico com lesões teciduais ou sistêmicas irreversíveis, inclusive fatais. Como pode ser observado na doença de Chagas⁽¹²⁻¹⁴⁾ na Leishmaniose^(5,15) e Esquistossomose.^(6,16)

Pacientes com doença de Chagas, nas formas indeterminada, cardíaca e digestiva, apresentam concentrações séricas semelhantes de IFN- γ , TNF- α quando comparados

com indivíduos saudáveis.⁽¹²⁻¹⁴⁾ No entanto, ao se analisar o perfil de interleucinas nas diferentes formas clínicas, observam-se níveis superiores de IL-10 em indivíduos com a forma digestiva da doença.⁽¹³⁾

A IL-10 é importante para manter o equilíbrio da resposta imune celular por atuar em linfócitos T auxiliares suprimindo a produção de citocinas que estimulam a atividade de macrófagos e, conseqüentemente, as reações agudas de processos infecciosos.⁽²⁻⁴⁾ Contudo, a prevalência do perfil de resposta imune Treg, caracterizada por maior produção de IL-10, pode permitir o escape do parasito e o desenvolvimento de lesões crônicas graves.⁽¹³⁾

Comparando-se o grupo dos indivíduos chagásicos com manifestações clínicas graves com aqueles que não apresentam tal alteração, independentemente das formas clínicas, observam-se elevações significativas de IL-2 no primeiro grupo em relação ao segundo. Essa IL, juntamente com IFN- γ , atua em um perfil de resposta Th1 em que ocorre o estímulo de macrófagos infectados para a destruição de patógenos fagocitados e sobre linfócitos B para a produção de IgG.^(1,3,4) Dessa forma, a produção de IL-2 e IFN- γ será tão elevada quanto a intensidade do processo infeccioso, servindo, portanto, como parâmetro do prognóstico ou da gravidade da doença.⁽¹⁴⁾

Pacientes com a forma indeterminada da doença mantêm um equilíbrio na produção de IL pró- e anti-inflamatórias, sem que ocorra o predomínio de qualquer perfil de resposta imune celular, impedindo o estabelecimento da patologia.⁽¹²⁾

Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* sp, agentes etiológicos das leishmanioses, podem ativar diferentes mecanismos de resposta imune celular e humoral no hospedeiro, os quais apresentam produção de IL específicas que irão determinar o curso da infecção.^(5,15)

Em crianças com as formas oligoassintomáticas da leishmaniose visceral é possível detectar, através de imunoenensaio enzimático (ELISA), a presença de níveis aumentados de IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α e IL-10.^(5,15) Entretanto, em crianças na fase aguda de leishmaniose visceral, não são detectáveis IFN- γ , IL-12 e IL-2. Neste grupo ocorre elevação nos níveis de IL-10 e TNF- α , em comparação com o primeiro, além da presença de IL-4, em 100% dos casos, fato não observado em indivíduos subclínicos. A IL-4 é, portanto, importante para determinar a evolução clínica da doença. Esta IL é regulada pela produção de IFN- γ que promove a diminuição de seus níveis plasmáticos.⁽⁵⁾

Pacientes oligoassintomáticos em que são detectados apenas IL-2, IL-12 e IFN- γ evoluem para resolução espontânea do quadro.⁽⁵⁾ O segmento laboratorial destes pacientes revela que a diminuição de IFN- γ indica remissão completa da doença.⁽¹⁵⁾ No entanto, TNF- α e IL-10 estão associados às alterações sistêmicas e sintomatologia observadas na leishmaniose visceral.⁽⁵⁾

Tabela 1 - Utilização laboratorial de interleucinas no diagnóstico e prognóstico de doenças

Etiologia	Doenças	Interleucinas	Metodologia	Resultados
Parasitária	Doença de Chagas	IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-2	ELISA	Aumento de IL-10 na forma digestiva; IL-2 revela a gravidade da doença;
	Leishmaniose	IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α e IL-10	ELISA	IL-4, IL-10, TNF α detectáveis na fase aguda de leishmaniose visceral; IL-2, IL-12 e IFN- γ subclínicos indicam evolução com resolução espontânea;
	Esquistossomose	IL-2, TNF- α	ELISA	IL-2 e TNF- α elevados 15,40% e 67,18% em infecções intestinais; e aumento de 111,29% e 128,12%, respectivamente, em neoplasia de cólon associada ao parasitismo;
Bacteriana	Brucelose	IL-2R, IL-6 e IL-8	CLIA	Concentrações associadas à gravidade e padrão clínico da doença;
	Sepse	IL-6, IL-10, IL- β e TNF- α	ELISA, CLIA	IL-6 excelente marcador de sepse tardia em recém-nascidos, eleva-se de 6 a 12 horas na corrente sanguínea; TNF- α acompanha IL-6; IL-10 também sofre elevação;
	Hanseníase	IL-1 β	ELISA	Bom indicador da resposta imune inata;
Inflamatória	Pancreatite	IL-6, IL-18, MIF, IFN- γ	ELISA, CLIA	IL-6 maior que 131,87 pg/mL doença grave; 83,29 pg/mL, necrose pancreática e 154,82 pg/mL, risco de morte; elevação de IL-18 faz diagnóstico nas primeiras 24 horas;
	Apendicite	IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10	ELISA, CLIA	Elevação das IL. Maior aumento de IL-6 diagnóstico do quadro. Níveis diminuídos de IL-6 excluem suspeita de apendicite;
	Hérnia de disco	TNF- α , IL-6	ELISA	A concentração de IL reflete o grau de inflamação dos discos vertebrais;
	Doenças Cardiovasculares	IL-6, IL-18	ELISA	IL-6 acima do ponto de corte de 3,7 em pacientes com SCASSST indica risco maior de IAM; IL-18 elevada em pacientes diabéticos com síndrome coronariana;
	Anemia Falciforme	IL-8	ELISA	Marcador de crises vaso-oclusivas;
Viral	Dengue	IL-6, TNF- α e IFN- γ	ELISA	Níveis maiores de TNF- α na febre hemorrágica do dengue; de IFN- γ em infecções primárias; e TNF- α e IL-6 em infecções secundárias;
	Hepatite C	IL-8, sTNFR-II, IL-18, IL-10, IL-12	ELISA	IL-8 e sTNFR-II: sensibilidade de 100% no diagnóstico de carcinoma hepatocelular; níveis de IL-18 predizem progressão de gravidade da doença para disfunção hepática (cirrose); IL-10 e IL-12 associados à trombocitopenia em pacientes com cirrose classe A;
	Vírus Sincicial Respiratório	IL-10, IL-6	ELISA	Elevações associadas à gravidade da doença, sendo que aqueles com aumento de IL-6 tiveram tempo de oxigenação e internação prolongados.

Esquistossomíase

A detecção sérica de IL-2 e TNF- α por métodos imunoenzimáticos pode ser utilizada para complementar o diagnóstico de esquistossomose colônica e câncer de cólon, associados à infecção por *Schistosoma mansoni*.⁽⁶⁾

O parasitismo crônico pelo platelminto *S. mansoni*, caracterizado pela deposição maciça de ovos, ocasiona lesão tecidual devido à inflamação local com infiltração celular, atrofia do epitélio da mucosa intestinal, redução de glândulas e desenvolvimento de diferentes graus de fibrose. Nestes

casos, os níveis de IL-2 e TNF- α se apresentam elevados, quando comparados com indivíduos saudáveis. Em pacientes com o desenvolvimento de neoplasia de cólon, associada à esquistossomose, os valores de IL-2 e TNF- α se apresentam com grandes elevações.⁽⁶⁾ Esta relação, contudo, não pode ser aplicada a outras IL e não são consideradas úteis no diagnóstico de lesões crônicas associadas à infecção por *S. mansoni*. A progressão da fibrose de Symmers, em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, não está relacionada às concentrações séricas de IL-10 e IL-13.⁽¹⁶⁾

INTERLEUCINAS E BACTERIOSES

As infecções bacterianas apresentam, na maioria das vezes, quadros clínicos agudos que exigem tratamento urgente e eficaz. Dessa forma, o diagnóstico e prognóstico precoces impedem maiores complicações nos pacientes. Algumas IL têm sido relatadas como ferramenta diagnóstica, que visa antecipar o resultado de cultura, exame que necessita, aproximadamente, de 2 a 7 dias para a sua execução e indicação da antibioticoterapia.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Brucelose

Pacientes com infecção por *Brucella* sp apresentam elevações significativas nos níveis séricos do receptor de IL-2 (IL-2R), IL-6 e IL-8 que são possíveis de serem detectadas através da metodologia de quimioluminescência.⁽¹⁹⁾

Durante a resposta imune contra microrganismos infecciosos, a IL-2 regula o processo inflamatório, através da ativação e proliferação de linfócitos T auxiliares, responsáveis pela produção de mediadores, tais como as interleucinas e o óxido nítrico.^(1,19) A IL-8, produzida por mastócitos, atua no processo de quimiotaxia e migração de linfócitos T e polimorfonucleares. Já a IL-6, produzida por linfócitos T, macrófagos e células endoteliais, principalmente, atua no crescimento e diferenciação de linfócitos T e B e estimula a produção de proteínas de fase aguda durante os processos inflamatórios e/ou infecciosos.^(3,4)

Em estudo conduzido por Refik e colaboradores,⁽¹⁹⁾ não foram evidenciadas diferenças nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-1 β em indivíduos com brucelose. No entanto, elevadas concentrações de IL-2R, IL-6 e IL-8 parecem estar diretamente relacionadas à gravidade e padrão clínico da doença.

Sepse

A dosagem de IL-6 pode ser realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e empregada, também, para o diagnóstico precoce de sepse tardia em recém-nascidos associada à detecção de proteína C reativa (PCR), como demonstrado em estudo realizado por Cecon e colaboradores.⁽¹⁸⁾ A associação entre estes dois marcadores apresentou sensibilidade e valor preditivo negativo de 100% nos dias 0 e 1 de suspeita diagnóstica, fato não observado ao se considerarem as detecções separadamente.

Em crianças com diagnóstico de sepse comprovado através do exame de hemocultura, as concentrações de IL-6 foram superiores em comparação àquelas em que a hemocultura foi negativa, mesmo persistindo a suspeita clínica. Supõe-se que, no primeiro grupo, há maior quantidade de bactérias circulantes, com maior liberação de endotoxinas, que promovem a estimulação na produção de interleucinas superior à do segundo grupo. Contudo, os dois grupos apresentaram elevações nos níveis de interleucinas superiores ao ponto de corte de 245 pg/mL, sugerido pelos autores.⁽¹⁸⁾

A IL-6 representa um excelente marcador precoce de sepse tardia em recém-nascidos,^(8,17,18) pois eleva-se na corrente sanguínea 6 a 12 horas antes de agir em seus receptores hepáticos para a produção de proteínas de fase aguda, por exemplo a PCR.⁽¹⁸⁾ Todavia, apresenta uma tendência de queda até 48 horas após o início da infecção,⁽¹⁷⁾ o que não ocorre com a PCR, que se mantém elevada até o sétimo dia.⁽¹⁸⁾

As dosagens de interleucinas apresentam maior sensibilidade, porém são menos específicas do que a dosagem de PCR no dia de suspeita diagnóstica. Indica-se a associação entre os dois marcadores e a realização de dosagens seriadas para avaliar a remissão do processo infeccioso.⁽¹⁸⁾

Caldas e colaboradores,⁽⁸⁾ em estudo semelhante, demonstraram que TNF- α se comporta como a IL-6, elevando-se no início do processo infeccioso quando se emprega a metodologia de quimioluminescência para a sua detecção. No entanto, esses autores defendem a utilização do leucograma e dosagens de PCR para o diagnóstico de sepse neonatal tardia, ao afirmarem que estes exames estão mais disponíveis na prática clínica com técnicas de execução mais padronizadas e de custo mais acessível e que podem auxiliar o clínico da mesma forma que a detecção das interleucinas.

Campos e colaboradores⁽¹⁷⁾ realizaram dosagens de IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α através do método ELISA em sangue de cordão umbilical no momento do parto, em sangue periférico na data do diagnóstico de sepse e, ainda, às 48 e 96 horas após o início do tratamento. Os neonatos que apresentavam elevadas concentrações de interleucinas durante o processo infeccioso já as manifestavam no sangue de cordão umbilical, persistindo até 96 horas após o diagnóstico, quando se considerou IL-10 e TNF- α , o que indicou que o processo infeccioso já estava em curso. Entretanto, não foram observadas variações nos níveis de todas as interleucinas analisadas, no decorrer do tempo.

Existem algumas dificuldades ao se implantar a dosagem de interleucinas na prática diagnóstica, entre elas o custo elevado da execução da técnica, a ausência de valores de referência confiáveis e a variabilidade das concentrações, levando-se em conta os diferentes indivíduos e as influências do meio externo.⁽⁸⁾

INTERLEUCINAS E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

Pancreatite

Doenças que evoluem com resposta inflamatória intensa apresentam perfis específicos de IL séricas, que podem ser quantificadas para antecipar o prognóstico.^(9,20,21)

Em pacientes com pancreatite aguda endemática e necrosante, é possível verificar a elevação de IL-6 e MIF (fator inibitório da migração de macrófagos) diretamente relacionadas às complicações da doença.⁽²⁰⁾ Estas detecções têm sido indicadas, inclusive, para o diagnóstico precoce de SIRS

– Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – responsável pelas altas taxas de mortalidade. No entanto, a IL-6 não apresenta concentrações séricas significativas capazes de diferenciar quadros de pancreatite leve e aguda onde é observada necrose e edema.^(7,20)

A literatura tem sugerido alguns pontos de corte para as concentrações séricas de IL-6, com o objetivo de auxiliar o diagnóstico de possíveis complicações, sendo eles: 131,87 pg/mL para a gravidade da doença, 83,29 pg/mL para a necrose pancreática e 154,82 pg/mL para risco de morte.⁽²⁰⁾

Pode-se realizar, ainda, a quantificação de IL-18, que possui valor preditivo para pancreatite, já nas primeiras 24 horas.⁽⁷⁾ Esta interleucina é produzida por macrófagos ativados e células de Kupffer e atua na indução de produção de INF- γ por células T e células *natural killer*, promovendo, também, a indução de um perfil Th1.^(1,3,4) Em casos de pancreatite aguda sistêmica, a IL-18 pode atingir valores séricos até 20 vezes maiores, comparativamente a outros pacientes com pancreatite aguda grave, levando, igualmente, ao aumento simultâneo de INF- γ .⁽⁷⁾

Diferentemente de IL-6 e IL-18, que expressam, precocemente, concentrações elevadas na pancreatite aguda, níveis séricos de receptor de IL-1 são detectáveis, por método ELISA, apenas no sétimo dia de sintomas, o que indica a presença de áreas de necrose e inflamação.⁽⁷⁾

Apendicite

A IL-6 tem se mostrado um excelente marcador de apendicite aguda em crianças, fato não observado em pacientes adultos, onde as dosagens de PCR, em associação com o leucograma, apresentam maior sensibilidade no diagnóstico da doença.^(9,22) Em crianças, a PCR é útil para o diagnóstico apenas após 24 horas do início dos sintomas, enquanto que a IL-6 sofre elevação já nas primeiras horas.⁽²²⁾ Estudos mostram que as dosagens de IL-6, aproximadamente 6 horas após a internação, revelam níveis significativamente elevados desta interleucina que está diretamente relacionada à gravidade do quadro, e, por isso, apresenta maior sensibilidade em comparação ao leucograma e à dosagem de TNF- α .⁽⁹⁾

Em pacientes com apendicite aguda, a IL-6 eleva-se, precocemente, sendo as maiores concentrações encontradas no início dos sintomas. A prevalência de altos títulos pode ser utilizada para identificar indivíduos com perfuração intestinal, como complicação da doença.⁽⁹⁾ De forma contrária, níveis séricos de IL-6 diminuídos são confiáveis na exclusão de processos agudos que necessitem de intervenção cirúrgica.⁽²²⁾

Além da IL-6, a IL-1 β , IL-2, IL-8 e IL-10 podem ser quantificadas no diagnóstico de apendicite aguda em crianças por método de quimioluminescência,⁽⁹⁾ ou por ensaio imunoenzimático.⁽²²⁾ Em adultos, estas podem ser utilizadas para prever perfurações intestinais em decorrência da apendicite, apesar da baixa confiabilidade diagnóstica.⁽²²⁾

INTERLEUCINAS E OUTRAS DOENÇAS HUMANAS

Hérnia de disco

Indivíduos que apresentam lombalgia crônica por hérnia de disco mostram níveis distintos de TNF- α e IL-6 em comparação com indivíduos saudáveis. Nesses pacientes, ocorrem elevações significativas nas concentrações dessas citocinas, que refletem o grau de inflamação nos discos vertebrais. Outras interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o receptor solúvel de TNF (sTNF-R), no entanto, não apresentam diferenças em suas concentrações. É o processo inflamatório o responsável pelo quadro clínico da doença e pela queda na qualidade de vida dos pacientes⁽²¹⁾

Doenças cardiovasculares

Níveis elevados de IL-6 são observados em quadros agudos de instabilidade coronariana sendo, supostamente, responsáveis pela ruptura ou erosão de placas ateroscleróticas.⁽²³⁾ Estes níveis podem, também, indicar o prognóstico cardiovascular em pacientes com síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do segmento ST - SCASSST.⁽²⁴⁾

Ao dosar IL-6 no soro de noventa pacientes com SCASSST, Azevedo e colaboradores⁽²⁴⁾ obtiveram um ponto de corte para esta citocina, referente ao percentil 50, de 3,7. Após o acompanhamento destes pacientes por, pelo menos, 12 meses, foi observado que aqueles cujos níveis de IL-6 estavam maiores que 3,7 apresentavam risco 3,7 vezes maior de desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio.

Pacientes diabéticos com síndrome coronariana aguda apresentam níveis elevados de IL-6, IL-18 e PCR ultrasensível, porém os níveis destas citocinas não diferem significativamente de pacientes não diabéticos portadores da doença.⁽²³⁾

Anemia falciforme

Durante as crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme, notam-se elevadas concentrações de IL-8 em decorrência do processo inflamatório que se instala devido às lesões ao endotélio capilar e órgãos. Em pacientes saudáveis, e mesmo naqueles com anemia falciforme que não apresentem crises vaso-oclusivas, os níveis de IL-8 são baixos ou indetectáveis.⁽²⁵⁾

Gonçalves e colaboradores⁽²⁵⁾ sugerem IL-8 como marcador de crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme, que pode ser detectada por ELISA. No entanto, consideram necessário novos estudos em que seja realizado o monitoramento de pacientes com a doença sem a manifestação de crises, com o objetivo de se detectar o início da elevação de IL-8, estabelecendo, assim, um ponto de corte que represente maior sensibilidade para o diagnóstico precoce das vaso-oclusões.

As crises vaso-oclusivas representam papel importante na patogênese da anemia falciforme, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de complicações crônicas e

frequentes intervenções médico-hospitalares. Diante disso, a busca por marcadores laboratoriais que indiquem predisposições precoces dos pacientes às crises se torna fundamental.

INTERLEUCINAS E DOENÇAS VIRAIS

Dengue

Em crianças menores de um ano, infectadas com o vírus do dengue na fase aguda da doença, os níveis de IL-6, TNF- α e IFN- γ encontram-se elevados em comparação a crianças saudáveis.⁽²⁶⁾ As concentrações dessas interleucinas não estão estatisticamente relacionadas às diferentes formas clínicas da doença. No entanto, observam-se níveis maiores de TNF- α na febre hemorrágica em comparação à febre não hemorrágica do dengue. No primeiro contato com o vírus, isto é, durante as infecções primárias, ocorre elevação de IFN- γ , todavia, durante os processos infecciosos secundários, nota-se a elevação de IL-6 e TNF- α .⁽²⁶⁾

Hepatite C

Determinações séricas de interleucinas podem ser utilizadas no diagnóstico de carcinoma hepatocelular (HCC) e outras complicações crônicas decorrentes de infecção pelo vírus da hepatite C.⁽²⁷⁻²⁹⁾

As citocinas estão diretamente envolvidas na progressão da doença em pacientes portadores de hepatite C. A IL-8 e o receptor solúvel de TNF (sTNFR-II) se correlacionam estatisticamente à atividade das enzimas hepáticas e à carga viral do vírus HCV, ao contrário da IL-2.⁽²⁷⁾

Para o diagnóstico de carcinoma hepatocelular, as dosagens associadas de IL-8 e sTNFR-II apresentam sensibilidade de 100%, especificidade de 70,6%, valor preditivo negativo (VPN) de 100% e valor preditivo positivo (VPP) de 85,7%. Em pacientes com diagnóstico de HCC, essas dosagens revelaram ponto de corte para as concentrações dessas interleucinas compatível em 100% dos indivíduos analisados. O ponto de corte estabelecido para diagnóstico de HCC é sTNFR-II maior do que 398 pg/mL e IL-8 menor do que 290 pg/mL. Quando o paciente apresenta a infecção pelo vírus HCV com persistência normal de alanina aminotransferase (ALT), observa-se elevação de IL-8 maior que 395 pg/mL.⁽²⁷⁾

Níveis séricos elevados de IL-18 estão relacionados ao desenvolvimento de cirrose hepática em pacientes portadores de hepatite C. Esta interleucina se encontra elevada nos casos de hepatite C crônica, no entanto, se apresenta com níveis mais acentuados naqueles pacientes que evoluem para cirrose. Dessa forma, as concentrações de IL-18 podem ser utilizadas para prever a progressão e gravidade associadas à disfunção hepática.⁽²⁸⁾

Em pacientes que apresentam cirrose classe A e trombocitopenia, as concentrações séricas de IL-10 e IL-12 encontram-se elevadas, o que reflete as possíveis causas na diminuição de plaquetas. Abdallah e colaboradores⁽²⁹⁾

sugerem a utilização de dosagens laboratoriais dessas interleucinas como marcadores de trombocitopenia moderada a grave, em pacientes com hepatite C crônica.

CONCLUSÃO

O presente trabalho corrobora com a hipótese de que as IL podem ser consideradas no prognóstico e acompanhamento laboratorial de diferentes doenças humanas. Notadamente, a regulação da produção de IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, IL-2, IFN- γ e IL-4 parece ser afetada por diferentes agentes etiológicos, o que, dependendo de diversos fatores envolvidos na agressão e na defesa, pode contribuir como um importante "gatilho" na atenuação e/ou modulação da resposta imunológica.

A aplicação das IL como marcadores do prognóstico de doenças humanas precisa ser validada em estudos inter e intratestes para um melhor conhecimento das causas de variação técnica e imponderabilidade biológica. Ao se validarem parâmetros estatísticos e laboratoriais confiáveis, esses poderão contribuir para uma eventual incorporação da determinação das IL, na prática clínico-laboratorial.

Abstract

Clinical laboratories of outstanding international quality provide quantification of human interleukins (IL) by different methods such as enzyme immunoassays (ELISA, EIA MEIA), chemiluminescence (CLIA) and electrochemiluminescence (ECL). However, in Brazil, the request of the IL determinations is restricted to a few clinical laboratories due to the higher cost of the tests. Nonetheless, it is well known that some IL may anticipate the prognosis and estimate the severity of diseases, allowing to prescribe effective treatments, avoiding the worsening of the clinical conditions. Then, by IL determinations, is possible to predict the degree of tissue injury or the patient's recover for some diseases. This work aims to present the use of interleukins determination in the prognosis and monitoring of diseases by ELISA, CLIA, ECL.

Keywords

Interleukins; Diagnostic; Diseases

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células. In Abbas AK, Lichtman AH (eds). *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 307-26.
2. Naoum PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2001;23(2):15-23.
3. Murphy K, Travers P, Walport M. Imunidade mediada por célula T. In: _____. *Imunologia de Janeway*. 7ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 366-369p.
4. Murphy K, Travers P, Walport M. Dinâmica da Imunidade Adaptativa. In: _____. *Imunologia de Janeway*. 7ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 419-428p.
5. Gama ME, Costa JM, Pereira JC, Gomes CM, Corbett CE. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz. J Med Biol Res*. 2004;37(1):129-36.
6. Hamed MA1, Ahmed SA, Khaled HM. Efficiency of diagnostic biomarkers among colonic schistosomiasis Egyptian patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):322-9.

7. Martín MA, Saracibar E, Santamaría A, Arranz E, Garrote JA, Almaraz, et al. Interleukin 18 (IL-18) and other immunological parameters as markers of severity in acute pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100(12):768-73. [Article in Spanish]
8. Caldas JPS, Marba STM, Blotta MHSL, Calil R, Morais SS, Oliveira RTD. Acurácia diagnóstica do leucograma, proteína C-reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α na sepse neonatal tardia. *J Pediatr.* 2008;84(6):536-42.
9. Groselj-Grenc M, Repse S, Vidmar D, Derganc M. Clinical and laboratory methods in diagnosis of acute appendicitis in children. *Croat Med J.* 2007;48(3):353-61.
10. Costa RD, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AMDD, Costa MD, et al. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonistas do receptor de interleucina 1 (IL-1 Ra) e pacientes com hanseníase. *Rev Bras Med Trop.* 2008;41(2):99-103.
11. Vieira RA, Diniz EMA, Ceccon MEJR. Correlação entre mediadores inflamatórios na secreção nasofaríngea e no soro de crianças com infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório e a gravidade da doença. *J Bras Pneumol.* 2010;36(1):59-66.
12. D'Ávila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvão LM. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):100-5.
13. Pisseti CW, Correia D, Braga TT, Faria GEL, Oliveira RF, Ribeiro BM, et al. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , INF- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(4):425-30.
14. Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RM.. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(3):285-9.
15. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis.* 2009;13(1):44-6.
16. Brandt CT, Rino M, Pitta MGR, Muniz JS, Silveira DO, Castro CMMB. Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores da progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37(5):333-7.
17. Campos DP, Silva MV, Machado JR, Castellano LR, Rodrigues V, Barata CHC. Sepse neonatal precoce: níveis de citocina no sangue de cordão umbilical no diagnóstico e durante o tratamento. *J Pediatr.* 2010;86(6):509-14.
18. Ceccon MEJR, Vaz FAC, Diniz EMA, Okay TS. Interleucina 6 e Proteína C Reativa no diagnóstico de sepse tardia do recém-nascido. *Rev Assoc Med Bras.* 2006;52(2):79-85.
19. Refik M1, Mehmet N, Durmaz R, Ersoy Y. Cytokine profile and nitric oxide levels in sera from patients with brucellosis. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(11):1659-63.
20. Dambrasuskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, et al. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(15):1845-53.
21. Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellar O, Santos-Jesus R, Carvalho EM. Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross sectional study. *Sao Paulo Med. J.* 2010;128(5):259-62.
22. Sack U, Biereder B, Elouahidi T, Bauer K, Keller T, Tröbs RB. Diagnostic value of blood inflammatory markers for detection of acute appendicitis in children. *BMC Surgery.* 2006;6(15):1-8.
23. Souza JR, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na Síndrome Coronariana Aguda sem supradesnivelamento do segmento ST em pacientes com Diabetes tipo 2. *Arq Bras Card.* 2008;90(2):94-9.
24. Azevedo EM, Medeiros AMB, Soster JM, Pereira DRR, Aguiar DC. Valor prognóstico da interleucina-6 na evolução de pacientes com síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do segmento ST. *Scien Med.* 2006;16(4):162-7.
25. Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, et al. Interleukin-8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(10):1309-13.
26. Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Alvarez LG. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(1):6-10.
27. Zekri AR, Alam El-Din HM, Bahnassy AA, Zayed NA, Mohamed WS, El-Masry SH, erum levels of soluble Fas, soluble tumor necrosis factor-receptor II, interleukin-2 receptor and interleukin-8 as early predictors of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients with hepatitis C virus genotype-4. *Comp Hepatol.* 2010;9(1):1
28. Sharma A1, Chakraborti A, Das A, Dhiman RK, Chawla Y. Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e514-22.
29. Abdallah N, Aziz HKA, Hamed NA, Gamal M. Correlation between serum levels of interleukins 10 and 12 and thrombocytopenia in hepatitis C cirrhotic (class A) patients. *J Venom Anim Toxins incl. Trop Dis.* 2010;16(3):456-46.

Correspondência

Marcelo Fernandes da Silva

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Depto de Ciências Biológicas

38050-600 – Rod BA-415, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA

Telefone: (73) 3680-5268

Avaliação citogenética de frentistas expostos ao benzeno em postos de gasolina de Campo Maior, PI

Cytogenetic assessment of attendants exposed to benzene in gas stations in Campo Maior, PI

José Martins Soares Filho¹

Denise de Santana Silva Martins¹

Ana Amélia de C. Melo Cavalcante^{1,2}

Tatiana Vieira S. Chaves^{1,2}

Resumo

O biomonitoramento do risco ocupacional em trabalhadores expostos ao benzeno e derivados é realizado como diagnóstico e prevenção de danos a curto e longo prazo ao material genético. Testes de curta duração que determinam o perigo genético são categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores fortalece a importância dos testes de genotoxicidade. O estudo objetiva avaliar o risco de mutagenicidade e anormalidades nucleares em indivíduos expostos ao benzeno. Avaliaram-se células da mucosa oral (teste de micronúcleos), sangue periférico (hemograma automatizado) de vinte frentistas da cidade de Campo Maior, PI, e do grupo controle, além da aplicação do questionário de estudo epidemiológico. Relacionaram-se os resultados ao estilo de vida desses profissionais. A frequência de micronúcleos no grupo exposto foi significativa (** $P < 0,0001$ / Student's t-test), assim como a frequência de anormalidades nucleares para cariólise (** $P < 0,001$) e para binucleação (* $P < 0,05$). A frequência de cariólise e etilismo ($r = 0,464$) também apresentou uma correlação positiva (* $P < 0,05$). Evidenciou-se que essa exposição ao petróleo e derivados induz mutagenicidade, citotoxicidade e apoptose, sendo necessário, por isso, conscientizar empregadores e trabalhadores dos postos de gasolina sobre o uso de EPI e intensificar o monitoramento ocupacional.

Palavras-chave

Genotoxicidade ocupacional; Micronúcleos; Células da mucosa oral

INTRODUÇÃO

A espécie humana, durante toda a sua evolução, vem sendo exposta a uma infinidade de agentes genotóxicos pela ingestão de alimentos, bebidas e pela inalação de fumaças e irradiações do meio ambiente.⁽¹⁾ Os efeitos mutagênicos e carcinogênicos desses agentes genotóxicos são, principalmente, decorrentes de exposição ambiental, acidente ou estilo de vida.^(1,2) Diversas substâncias estão envolvidas na genotoxicidade e relacionadas com os vários estágios da carcinogênese.⁽³⁾ O monitoramento genético contínuo de indivíduos expostos a potenciais mutagênicos e carcinogênicos é uma forma precoce de prevenção para doenças genéticas e câncer. Contudo, os indivíduos estão geralmente expostos a uma variada mistura de substâncias químicas e agentes físicos que podem dificultar a determinação exata da causa do aumento na frequência do dano cromossômico.⁽⁴⁾

O câncer será a primeira causa de mortalidade, no mundo, nas próximas décadas. Associado a este fato, as doenças neoplásicas possuem um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir um sério problema de saúde pública.⁽⁵⁾ Estimativas feitas no Piauí, pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA),⁽⁶⁾ no ano 2010, permitem inferir que, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes, o número de novos casos de câncer, em homens, será de 2.260, e, em mulheres, de 2.380, segundo localização primária

Assim, é importante conhecer os efeitos tóxicos e genotóxicos do benzeno e seus derivados, constituintes químicos presentes nos combustíveis, sobre a saúde humana e, principalmente, sobre os trabalhadores de postos de gasolina expostos de forma contínua devido à rotina de trabalho. O benzeno interfere no sistema produtor de células sanguíneas, podendo causar efeitos como a leucopenia,

Laboratório de Genética Toxicológica do Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí - Lacen – Teresina, PI.

¹Faculdade de Saúde Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí – Novafapi – Teresina, PI.

²Secretaria de Saúde do Estado do Piauí; Centro de Referência Estadual em Saúde do Trabalhador – Teresina, PI.

anemia, trombocitopenia e leucemia.⁽⁷⁾ Os efeitos tóxicos de derivados do benzeno podem ser detectados em exames laboratoriais e os efeitos genotóxicos por biomarcadores citogenéticos.⁽⁸⁾

Diversos testes de curta duração estão disponíveis para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são frequentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, com os mecanismos conhecidos de ativação de proto-oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade.⁽⁹⁾ Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar as possíveis alterações hematológicas e o aumento na frequência de danos mutagênicos em frentistas expostos ao benzeno e seus derivados, na cidade de Campo Maior, PI.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional transversal, submetido à apreciação e aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí - NovaFapi (nº 0052. 0.043.000-09). O estudo foi dividido em dois grupos de vinte indivíduos do sexo masculino, sendo que o grupo teste compreendeu vinte frentistas que trabalhavam em postos de gasolina da cidade de Campo Maior. Esses profissionais estavam expostos, diariamente, aos derivados do benzeno presentes na gasolina e no óleo diesel, além da exaustão de gases dos veículos automotores. O grupo controle apresentou vinte profissionais de áreas administrativas que não tinham nenhum contato direto com derivados do benzeno. Os dados de saúde e estilo de vida foram obtidos com a aplicação do questionário de saúde recomendado pela *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and a Carcinogens*.⁽¹⁰⁾

Uma das formas de se avaliar a toxicidade dos derivados do benzeno, em frentistas, é através da realização do hemograma automatizado, confirmado com rigorosa leitura manual de lâminas e pesquisa de reticulócitos. A coleta sanguínea foi realizada na fossa antecubital, com aproximadamente 5 mL do sangue total, o qual foi e armazenado em tubo de ensaio, contendo uma gota de EDTA (Hemstab).⁽¹¹⁾

Para avaliação citogenética e mutagênica, foi aplicado o biomarcador teste de micronúcleos, em células esfoliadas de mucosa bucal. O teste é, atualmente, usado como padrão para teste de mutagenicidade cromossômica e segue a norma OECD - *Guidelines for the Testing of Chemicals/section 4: Health Effects - Mammalian Erythrocytes, Micronucleus Test* nº 474 e a recomendação do Gene - *Tox Program, Environmental Protection Agency – EPAIUS*. As amostras foram coletadas das duas paredes laterais da mucosa da cavidade oral com o uso da escova *cytobrush*, sem coleta de amostras de células epiteliais da língua. As células foram colocadas em 5 mL de solução de lavagem (PBS), até a etapa de

preparação das lâminas.⁽¹²⁾ Imediatamente após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório para a confecção das lâminas para avaliação microscópica. As amostras de células foram lavadas por três vezes, antes da preparação do esfregaço. O processo de lavagem foi feito em 5 mL de solução PBS, com centrifugações por dez minutos, a 1.500 rpm, seguido de remoção do sobrenadante e substituição da solução, sempre no volume final de 5 mL. Antes da preparação do esfregaço, as lâminas foram pré-aquecidas a 37°C. As células foram homogeneizadas no vórtex e colocadas sobre as lâminas, para a realização do esfregaço, e deixadas em temperatura ambiente, para a secagem, durante 15 minutos.⁽¹³⁾

Realizou-se a fixação com metanol e ácido acético (3:1), durante 15 minutos.⁽¹⁴⁾ Foram preparadas duas lâminas para cada indivíduo. Após a fixação, as lâminas ficaram em temperatura ambiente, durante 12 horas, e, em seguida, foram imersas em água destilada, durante um minuto, antes da coloração com Giemsa a 2%. A observação das células foi feita com o uso de microscópio óptico, em aumento de 1.000 X, com o uso de óleo de imersão. Cerca de mil células foram observadas por lâmina, totalizando 2 mil células avaliadas para cada paciente testado. Para identificação de micronúcleos, consideraram-se as células com citoplasma e núcleo intactos e distinção do perímetro nuclear, procurando analisar o perímetro arredondado sugestivo de um revestimento por membrana, diâmetro correspondente a 1/3 do diâmetro do núcleo, coloração, intensidade e textura similares ao núcleo e ausência de ponte com ele. As anormalidades nucleares foram identificadas e quantificadas por critérios já estabelecidos. Essas foram consideradas como tipos celulares associados a processos de diferenciação. Identificaram-se as cariorrexes (fragmentação nuclear), cariólises (dissolução nuclear) e as células binucleadas.⁽¹⁵⁾

A caracterização dos trabalhadores e análises de correlações foram realizadas com o uso do programa SPSS versão 13.0. Os dados relativos à frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares foram correlacionados com o uso do programa Graphpad PRISM 5.0, com análise de significância pelo Test t-Student e correlação de Pearson.

RESULTADOS

Os dados de saúde e estilo de vida, como idade, etnia, tempo de exposição, uso de EPI's, carga horária de trabalho semanal, hábitos de fumar e consumo de bebidas alcoólicas e alimentos, caracterizaram a população do estudo a partir das informações apresentadas pelos pacientes em resposta às indagações do questionário de saúde recomendado pela *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and a Carcinogens* (ICPEMC) (Tabela I).

Os frentistas tinham em média 37 anos de idade, apresentando, em sua maioria, a etnia caucasiana (65%). Os trabalhadores expostos ao benzeno e seus derivados

Tabela I - Características da população de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, ano de 2009

Características da população	Expostos aos derivados de benzeno (N = 20)	Não expostos (N = 20)
Idade ^a	37,7 ± 10,59 ^a (20-59)	32,23 ± 6,81 ^a (20-46)
Grupo étnico		
Branco	20 %	22,7 %
Negro	15 %	36,4 %
Caucasiano	65 %	35,4 %
Tempo de trabalho no local	8,20 ± 5,43 ^a (2-22)	6,32 ± 7,27 ^a (1-27)
Uso de EPIs		
Sim	-	-
Não	100 %	-
Não informado	-	-
Carga horária semanal	48 ± 0,01 ^a	35,36 ± 9,94 ^a
Hábito de fumar		
Não	90 %	36,4 %
Sim	10 %	63,6 %
Consumo de álcool semanal		
Sim	90 %	68,2 %
Não	10 %	31,8 %
Consumo de medicamentos por dia		
Prescritos	100 %	77,3 %
Não prescritos	65 %	90,9 %
Consumo de carne em dias por semana	100 %	95,5 %
Consumo de vegetais		
Sim	-	13,6 %
Não	100 %	77,3 %

^a Média ± Desvio padrão
Fonte: Pesquisa Direta

informaram que estavam expostos, em média, por oito anos, cumprindo uma carga horária semanal de 48 horas, sem fazer o uso de EPI. Em relação aos hábitos dos trabalhadores, 90% não fumavam, 90% consumiam álcool, 65% faziam uso de medicamentos não prescritos e 100% dos indivíduos consumiam carne, em detrimento do uso de vegetais, na dieta.

O resultado do teste de micronúcleos de mucosa bucal dos frentistas de postos de gasolina de Campo Maior está informado na Tabela II. A frequência de micronúcleos, nesses trabalhadores expostos aos derivados do petróleo, apresentou-se aumentada, de forma estatisticamente

Tabela II - Avaliação mutagênica em células esfoliadas de mucosa bucal de frentistas de postos de gasolina expostos aos derivados do petróleo em Campo Maior, PI, no ano de 2009, com o teste de micronúcleos (MN)

Grupos	Micronúcleo ^a	Frequência (%) de MN
Expostos (N=20)	2,25 ± 0,96*** (1-4)	0,11 ± 0,05***
Não expostos (N=20)	0,40 ± 0,16	0,02 ± 0,03

^a 2000 células por indivíduo. Resultados expressos em Média ± erro padrão. Significância em ***P < 0,0001, em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o teste t.

significativa (***P < 0,0001 – Test t-Student), em relação aos indivíduos não expostos a esses agentes químicos, que apresentam potencial de mutagenicidade (Figura 1).

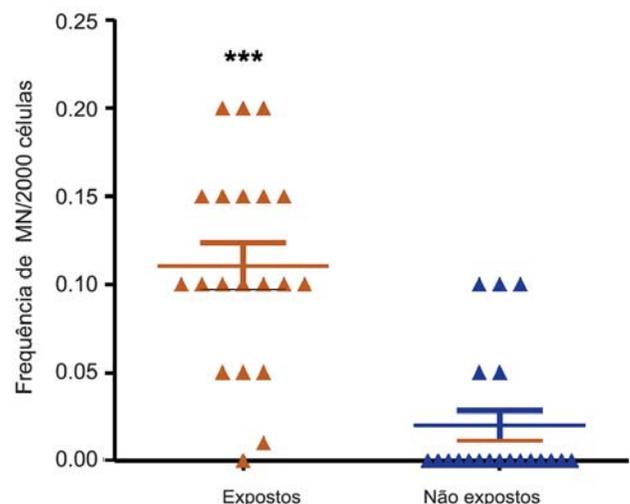


Figura 1. Mutagenicidade em células de mucosa bucal de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, PI, ano de 2009, avaliada com o teste de micronúcleos. Significância em ***P < 0,0001, em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o teste t.

Tabela III - Anormalidades nucleares identificadas em células de mucosa bucal de trabalhadores expostos aos derivados do benzeno como frentistas de postos de gasolina em Campo Maior, PI, ano de 2009

Anormalidades nucleares	Cariólise ^a	Frequência (%) de Cariólise ^a	Células Binucleadas ^a	Frequência (%) de Binucleada ^a
Expostos	99,85 ± 11,74**	4,82 ± 0,66**	7,20 ± 0,78*	0,36 ± 0,03*
Não expostos	49,20 ± 8,48	2,43 ± 0,44	4,80 ± 0,71	0,24 ± 0,03

^a 2000 células por indivíduo. Resultados expressos em Média ± erro padrão. Significância em **P<0,001 e *P<0,05 em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o teste t.

De forma similar, a frequência das células binucleadas e de cariólise, em células de mucosa bucal dos profissionais de postos de gasolina, apresentou-se aumentada, com significância estatística em relação ao grupo controle (Tabela III). Dados citotóxicos foram observados pelo significativo aumento da frequência de células binucleadas (*P<0,05), na população exposta, em relação à não exposta (Figura 2), e da cariólise (**P<0,001), indicando o fenômeno de apoptose (Figura 3). Esses dados foram correlacionados, positivamente, com o etilismo ($r = 0,464$), de forma significativa (*P<0,05), de acordo com as análises de correlações de Pearson, produzidas com o programa SPSS.

Os dados hematológicos da população exposta não foram estatisticamente significativas em relação aos indivíduos não expostos (Tabela IV), estando dentro dos valores de referência para o biomarcador estudado. A partir desses dados, foi possível avaliar a quantidade de leucócitos (Figura 4) e porcentagem do hematócrito (Figura 5).

As fotomicrografias mostram diferentes padrões de células da mucosa bucal dos trabalhadores expostos e não expostos aos derivados do petróleo. Células com padrões normais de diferenciação (grupo não exposto) podem ser observadas na Figura 6.

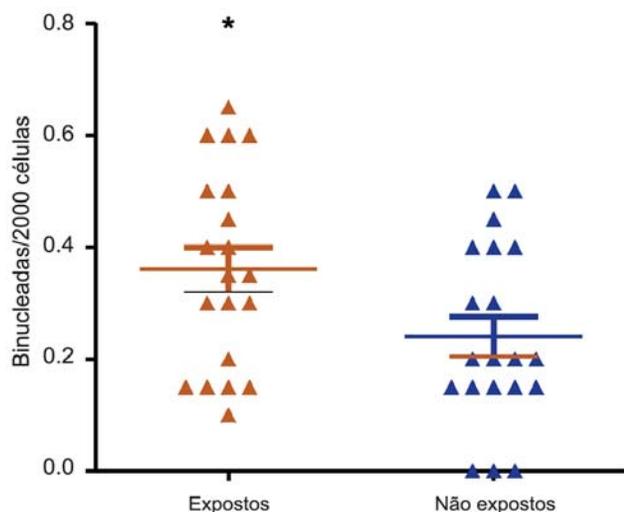


Figura 2. Células binucleadas de mucosa bucal de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, PI, ano de 2009, avaliadas com o teste de micronúcleos. Significância em *P< 0,05, em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o teste t.

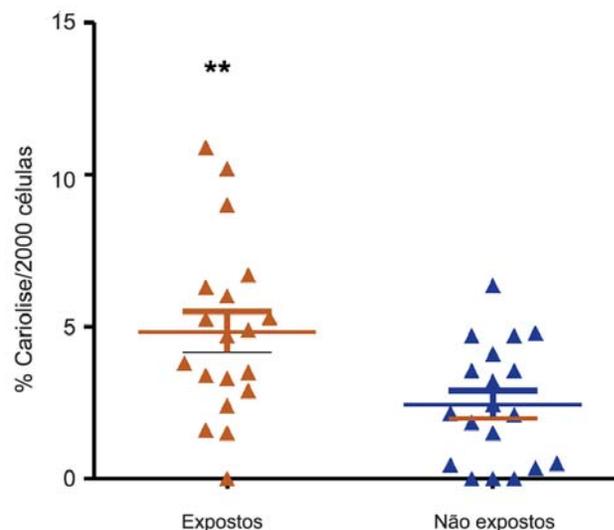


Figura 3. Cariólise em células da mucosa bucal de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, PI, ano de 2009, avaliada com o teste de micronúcleos. Significância em *P< 0,01, em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o teste t.

Tabela IV - Parâmetros hematológicos de frentistas de postos de gasolina de Campo Maior, PI, ano de 2009

Grupos	Hemácias (mm ³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/%)	Leucócitos (mm ³)	Plaquetas (mm ³)
Expostos	5,51 ± 0,11	48,09 ± 0,94	15,58 ± 0,29	6230 ± 494,8	234900 ± 9539
Não expostos	5,01 ± 0,07	46,50 ± 0,58	15,73 ± 0,26	5384 ± 208,4	237600 ± 11939

Resultados expressos em Média ± erro padrão.

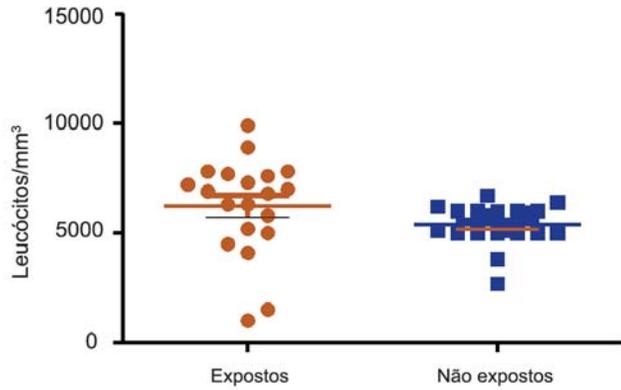


Figura 4. Quantidade de leucócitos no sangue periférico de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, PI, ano de 2009, avaliada com hemograma automatizado (Micros 60).

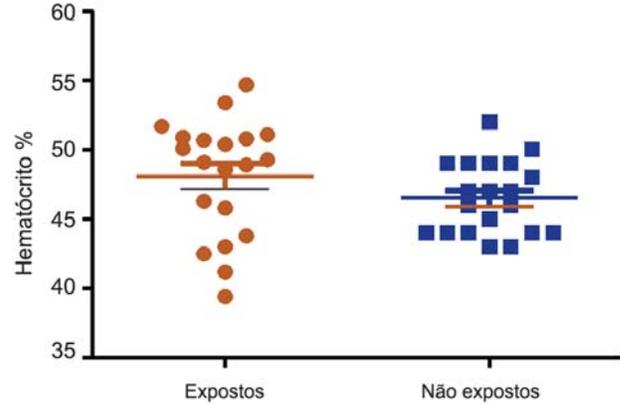


Figura 5. Porcentagem do hematócrito no sangue periférico de frentistas de postos de gasolina do município de Campo Maior, PI, ano de 2009, avaliada com hemograma automatizado (Micros 60).

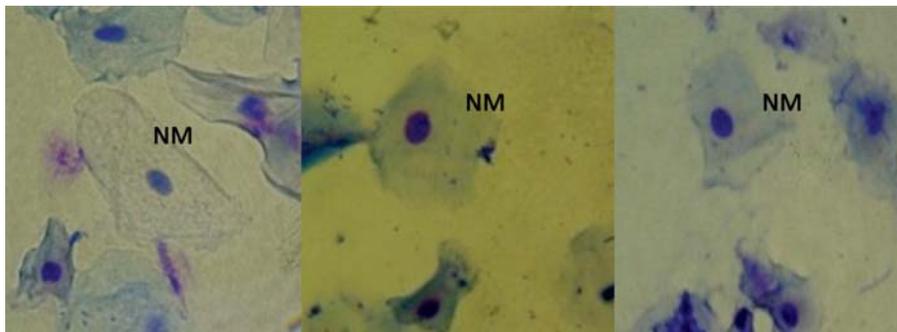


Figura 6. Fotomicrografia mostrando células com padrões normais de diferenciação (NM), grupo não exposto.

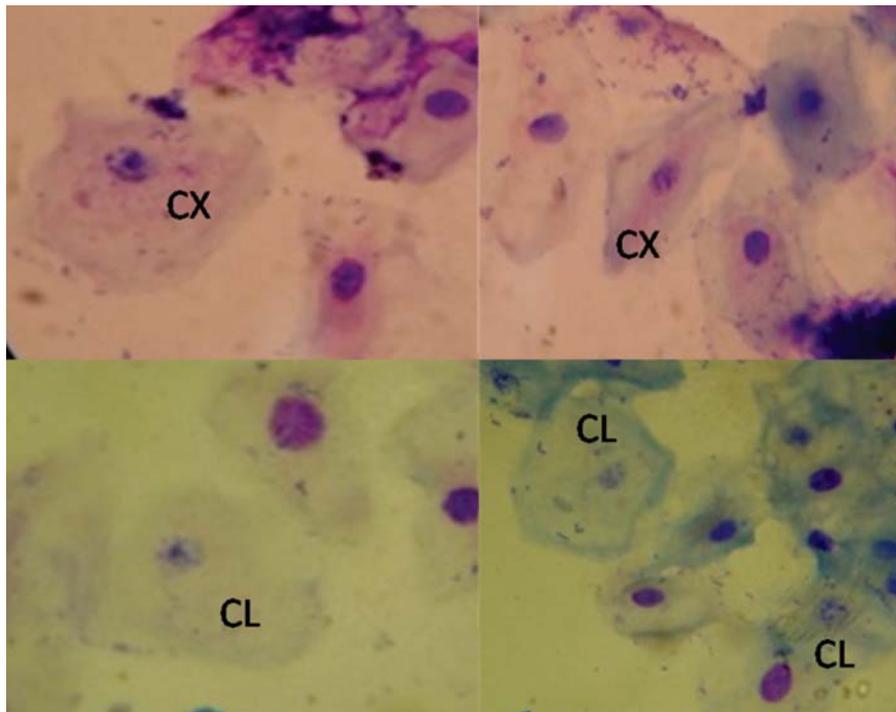


Figura 7. Fotomicrografia de anormalidades nucleares indicativas de apoptose (Cariorrexe-CX e Cariólise-CL) em frentistas de postos de gasolina, expostos ao benzeno e seus derivados em Campo Maior, PI, ano 2009.

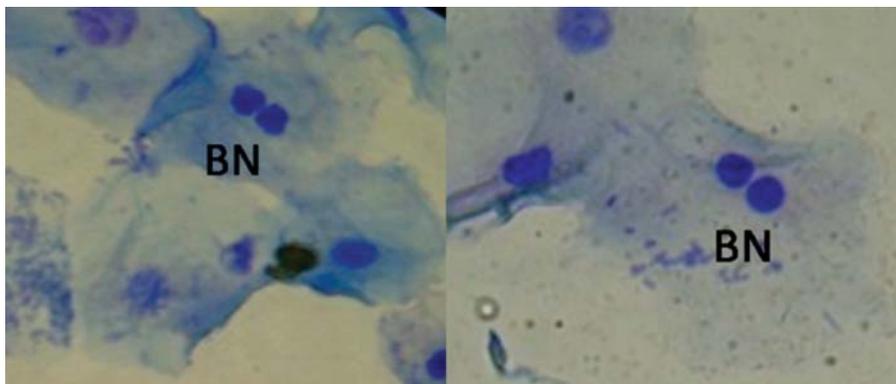


Figura 8. Fotomicrografia de células binucleadas (BN) indicativa de citotoxicidade em frentistas de postos de gasolina, expostos ao benzeno e seus derivados em Campo Maior, PI, ano 2009.

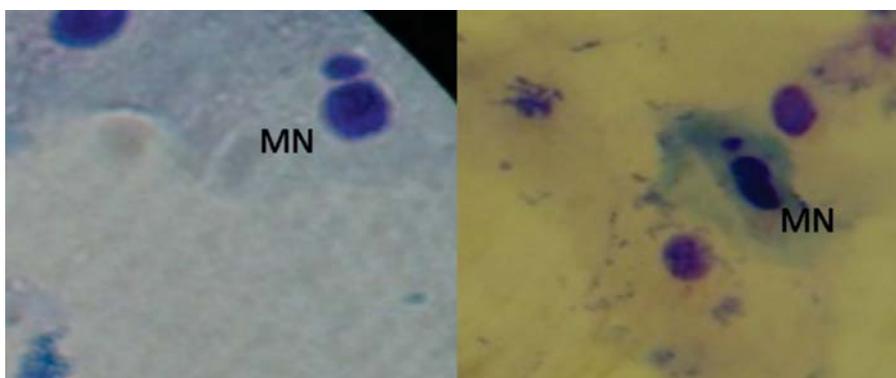


Figura 9. Fotomicrografia mostrando micronúcleos (MNs) em células esfoliadas da mucosa bucal de frentistas de postos de gasolina, expostos ao benzeno e seus derivados em Campo Maior, PI, ano 2009.

As anormalidades nucleares indicativas de apoptose, tais como cariorrexes (CXs) e cariólises (CLs), estão apresentadas na Figura 7, e a citotoxicidade (células binucleadas-BNs) é apresentada na fotomicrografia da Figura 8. A mutagenicidade, em células esfoliadas de mucosa bucal, indicada pela presença de micronúcleos e evidenciada em indivíduos expostos, está representada na Figura 9.

DISCUSSÃO

Os micronúcleos atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitorização.⁽¹⁶⁾ A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células.⁽¹⁷⁾ A existência de micronúcleo nas células esfoliadas serve como dosímetro interno, principalmente, na avaliação da extensão da associação entre determinado agente ambiental e a instabilidade genômica das células.⁽¹⁸⁾ O micronúcleo aparece após o dano antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou histológica, contribuindo em programas para detecção de grupos de alto risco e prevenção do câncer.⁽³⁾

Da mesma forma, após a remoção do carcinógeno, tem-se observado que a contagem de células com micronúcleos reduz-se rapidamente, sugerindo que, sem a ação do agente genotóxico, o processo de reparo do DNA se torna eficaz.⁽¹⁹⁾ A mutagenicidade foi observada pelo aumento significativo ($***P < 0,0001$) da frequência de micronúcleos da amostra exposta, em relação à não exposta aos derivados do petróleo. Uma pesquisa relatou os resultados de monitoramento biológico de um grupo de 48 trabalhadores, em uma refinaria de petróleo, no Norte de Portugal. Neste estudo, os autores encontraram uma frequência significativamente maior de micronúcleos (4.08 ± 0.46) do grupo exposto, em relação aos trinta indivíduos do grupo controle (1.97 ± 0.36).⁽⁸⁾ Em contraste, outros autores investigaram o grau de exposição a solventes orgânicos e as consequências genotóxicas em trabalhadores, usando acompanhamento citogenético (frequência de MN) e concluíram que não houve diferença estatística em biomarcadores genéticos, entre trabalhadores expostos e não expostos.⁽²⁰⁾

As indagações do questionário de saúde revelaram que 100% dos frentistas não utilizavam EPI, constatando-se, também, uma correlação positiva entre o não uso de EPI e o aumento da frequência de MN. Esses dados servem para alertar os órgãos responsáveis pela saúde do trabalhador,

bem como que o treinamento continuado e a conscientização de indivíduos sobre o uso de EPI devem ser intensificados para evitar possíveis danos irreparáveis à saúde. Estudos apontaram que, quanto maior o tempo e a frequência da exposição, maior a ocorrência do danos. O risco também está relacionado com a intensidade da exposição ao produto, isto é, da quantidade do produto que está contaminando o ar que se respira ou a quantidade que é depositada na pele ou, ainda, ao quanto se chega a ingerir. Essas formas de exposição aos agentes químicos (derivados do petróleo) estão, principalmente, relacionadas com a negligência dos trabalhadores e/ou de seus empregadores no que se refere ao uso dos equipamentos de proteção individual EPI.⁽²¹⁾

Os resultados mostraram que houve uma relação positiva entre o não consumo de vegetais na alimentação dos frentistas em estudo e o aumento da frequência de cariorrexes e cariólise. Isso influencia o aumento de danos no DNA, já que os micronutrientes têm função de manter a estabilidade genômica, sendo esse fato extremamente valorizado na literatura. Os micronutrientes têm fundamental importância para o metabolismo e reparo do DNA, pois agem como co-fatores e substratos e são necessários também para detoxificação de carcinógenos e apoptose.⁽²²⁾ Existem relatos de que a dieta pobre em micronutrientes aumenta o risco de doenças degenerativas, incluindo o câncer.⁽²³⁾

A frequência de cariólise está correlacionada, positivamente, com o etilismo ($r = 0,464$) de forma significativa ($*P < 0,05$). O consumo de álcool dos frentistas em estudo chegou aos 90%. A ingestão crônica de bebidas alcoólicas é relacionada aos diferentes tipos de câncer e com o aumento estatisticamente significativo na frequência de linfócitos com aberrações cromossômicas numéricas e estruturais.⁽²⁴⁾ O uso abusivo do álcool está relacionado à deficiência na absorção de folato (participando do processo de síntese e reparo do DNA) pelo organismo. Dessa maneira, indivíduos com carência de folato teriam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer bucal.⁽²⁵⁾ O etanol participa no processo de carcinogênese, sendo capaz de dissolver o conteúdo lipídico das membranas das células que compõem o tecido epitelial, causando um aumento na sua permeabilidade, o que facilita a penetração de carcinógenos químicos que irão causar dano ao DNA.⁽²⁶⁾

O tabaco industrializado contém uma grande quantidade de mutágenos e carcinógenos, caracterizando-o como um agente cancerígeno completo, que atua tanto na iniciação quanto na promoção e progressão tumoral, sendo considerado o principal fator de risco para o câncer bucal. As exposições de longo prazo de carcinógenos contidos no tabaco provocam efeitos mutagênicos nas células do epitélio da mucosa bucal, levando à instabilidade genômica e à ocorrência de ativação de receptores de proliferação celular como consequência desses dois efeitos (mutagênico e proliferativo). Os usuários do tabaco podem desen-

volver, na mucosa bucal, desde lesões pré-malignas até carcinomas invasivos.⁽³⁾ Relativamente, ao uso do fumo, o estudo informou que 90% dos frentistas não tinham tal hábito, não havendo nenhuma correlação entre o hábito de fumar e o aumento da frequência de cariólise, cariorrexes e micronúcleos, representando ausência de mutagenicidade, citotoxicidade e apoptose pelo uso do tabaco. Embora alguns autores tenham observado aumento na frequência de aberrações cromossômicas estruturais em fumantes, resultados negativos também foram documentados.⁽²⁷⁾

As alterações nucleares são indicativas de fenômenos celulares degenerativos (cariorrexes e cariólise). Na ocorrência de elevada prevalência, como evidenciada neste estudo, a cariólise ($**P < 0,001$) é indicativa de citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose e está, provavelmente, relacionada com a promoção de câncer. As células binucleadas, frequentemente encontradas em displasias, foram aqui observadas, sendo estatisticamente significativas ($*P < 0,05$), o que enfatiza a importância da inclusão da contagem de células com essas alterações, o que confirma a presença de danos citotóxicos.⁽¹⁵⁾

O sistema hematopoiético, em consequência das características biológicas, pode sofrer alterações quando exposto à ação de fatores ou substâncias nocivas presentes no ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos, dos quais se destaca o benzeno, as radiações ionizantes e os agrotóxicos. Tais fatores podem lesar a célula primitiva sanguínea, reduzindo seu número e/ou provocando alterações estruturais ou citogenéticas, levando, como consequência, à hipoprodução celular e/ou ao surgimento de linhagens de células anormais. Desse modo, as patologias hematológicas (leucopenia, leucemias, síndromes mielodisplásicas e anemia aplástica) representam a maior evidência de associação com fatores ambientais danosos.⁽²⁸⁾ Os dados hematológicos da população exposta não foram estatisticamente significantes em relação aos indivíduos não expostos, contrastando com os resultados hematológicos do sangue periférico mostrados numa pesquisa com 95 pacientes expostos cronicamente ao benzeno, sendo a macrocitose e a linfocitopenia sinais precoces de toxicidade desse elemento.⁽²⁹⁾

CONCLUSÃO

Os frentistas submetidos ao estudo apresentaram um aumento significativo de frequências de MN e demais anormalidades nucleares, correlacionadas com as atividades laborais desempenhadas por esses profissionais, bem como com as condições de proteção durante a jornada de trabalho, sugerindo que essa exposição induz à mutagenicidade, citotoxicidade e apoptose, sendo necessário, por isso, conscientizar os empregadores e trabalhadores dos postos de gasolina sobre a importância do uso de EPI e intensificar o monitoramento ocupacional, como uma forma precoce para a prevenção de doenças genéticas e câncer.

Sugere-se também a realização de testes moleculares, por conta das diferenças individuais em resposta à exposição ao benzeno e seus derivados, pela necessidade de identificar polimorfismo genético relacionado às enzimas de detoxificação, bem como genes supressores de tumor.

AGRADECIMENTO

Este artigo teve participação efetiva da Secretaria Estadual da Saúde através do Centro de Referência Estadual em Saúde do Trabalhador, Teresina, PI e do Laboratório de Genética Toxicológica do Laboratório Central de Saúde do Piauí; Laboratório de Análises Cínicas e Clínica Odontológica Ltda., Campo Maior, PI; e de todos os integrantes relacionados ao trabalho pelo apoio no desenvolvimento deste estudo.

Abstract

*Biomonitoring of occupational risk in workers exposed to benzene and its derivatives is carried out as diagnosis and prevention of harm in the short and long term to genetic material. Tests of short duration that determine genetic risk are categorized by biological indicators that assess: gene mutation, chromosomal damage or DNA damage. The close association of these indicators reinforces the importance of genotoxicity tests. The study aims to evaluate the risk of mutagenicity and nuclear abnormalities in individuals exposed to benzene. Evaluated the oral mucosa cells (micronucleus test), peripheral blood (CBC automated) of 20 attendants of Campo Maior, PI and control group, besides the application of the questionnaire for epidemiologic study. Related to the results to the lifestyle of these professionals. The micronuclei frequency in the exposed group was significant (**P < 0,0001/ Student's t-test) as well as the nuclear abnormalities frequency for karyolysis (**P < 0,001) and for binucleation (*P < 0,05). The karyolysis and alcohol consumption frequency (r = 0.464) also showed a positive correlation (*P < 0.05). It is evident that exposure to petroleum and its derivatives induce mutagenicity, cytotoxicity and apoptosis, requiring employers and employees aware of the gas stations on the use of PPE, and to enhance monitoring occupational exposure.*

Keywords

Occupational genotoxicity; Micronuclei; Oral mucosa cells

REFERÊNCIAS

- Maluf SW, Erdtmann B. Biomonitoramento do dano genético em humanos. In: Silva J da, Erdtmann B, Henriques JAP. (Orgs.) Genética toxicológica, Porto Alegre: Alcance, p. 183-205. 2003
- Sowa M1, Arthurs BJ, Estes BJ, Morgan WF. Effects of ionizing radiation on cellular structures, induced instability and carcinogenesis. *EXS*. 2006;(96):293-301.
- Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer*. 1992;50(2):172-6.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*. 1995;336(1):69-77.
- Organização Mundial De Saúde (OMS). Câncer. Genabra: Organização Mundial da Saúde. Nota descritiva nº. 297. Fevereiro, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>. Acesso em: 20 de setembro de 2009.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=PI>. Acessado em: 02 de fevereiro de 2010.
- Pesquero CR. Avaliação ambiental de compostos orgânicos aromáticos presentes em atmosferas industriais. São Paulo; 2001. [Tese de Doutorado - Instituto de Química da USP].
- Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res*. 2006; 604(1-2):19-27.
- Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, p. 173-200, 2003.
- Carrano A, Natarajan AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*. 1988;204(3):379-406.
- Lima OA, et al. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1977.
- Kassie F, Darroudi F, Kundi M, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Khat (Catha edulis) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int J Cancer*. 2001;92(3):329-32.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):93-108.
- Cerqueira EM, Meireles JR, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-Filho IS, Trindade S, et al. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol*. 2008;37(7):398-403.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77.
- Flores M, Yamaguchi MU. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo. 2008;3: p.337-40.
- Salvadori DMF, Ribeiro LR, Fenech M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003
- Martins KF, Filho J B. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos fumantes e não fumantes. *Rev Fac Ciênc Méd. Sorocaba*. 2003;1:4353.
- Barth TJ, Zöller J, Kübler A, Born IA, Osswald H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, alpha-tocopherol and vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res*. 1997;67(5):368-76.
- Cárdenas-Bustamante O, Varona-Urbe M, Patiño-Florez RI, Groot-Restrepo H, Sicard-Suárez D, Torres-Carvajal MM, et al. Bogotá paint-industry workers exposure to organic solvents and genotoxic effects. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2007; 9(2):275-88. [Article in Spanish].
- Freitas NBBF, Arcuri ASA. Riscos devido a substâncias químicas. *Cadernos de Saúde do Trabalhador*, Junho, 2000.
- Fenech M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*. 2005;20(4):255-69.
- Ames B. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res*. 2001;475(1-2):7-20.

24. Obe G, Anderson D. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res.* 1987;186(3):177-200.
25. Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S, et al. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2003;14(11):1677-81.
26. Ruiz FE, et al. Efectos del consumo de alcohol en la cavidad oral: relacion com el câncer oral. *Oral Medicine and Pathology.* 2004;9:14-23.
27. Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res.* 1998; 400(1-2):467-78.
28. Cazarin G. Doenças Hematológicas e ambiente: estudo do registro de condições de risco em serviço especializado. 2005. 159. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva, Recife.
29. Ruiz MA, et al. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao Benzeno. *Rev. Saúde Pública.* São Paulo. 1993;27(2).

Correspondência

Tatiana Vieira Souza Chaves

*Faculdade Novafapi – Coordenação de Biomedicina
Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 – Bairro do Uruguai.
64057-100 – Teresina, PI
tatianavsc@yahoo.com.br*

Avaliação laboratorial em pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise

Laboratory evaluation in chronic kidney disease patients undergoing hemodialysis

Bruna Somavilla Fronza¹
Eliane Roseli Winkelmann²
Juliana Schneider³
Matias Nunes Frizzo⁴

Resumo

Objetivo: Avaliar as alterações nos exames laboratoriais e de capacidade funcional nos pacientes com doença renal crônica (DRC), submetidos à hemodiálise. **Métodos:** Para a avaliação dos pacientes foram coletados os dados pessoais, histórico de fatores de risco e de comorbidades associadas à DRC, bem como o tempo e a frequência no tratamento hemodilítico, além dos resultados dos exames laboratoriais e da capacidade funcional máxima. **Resultados:** Dos 23 pacientes estudados, 21,7% apresentavam nefrosclerose como a principal causa de DRC. O sedentarismo apresentou-se como o principal fator de risco. Todos os pacientes apresentaram alteração nos resultados dos exames laboratoriais e de capacidade funcional, sendo que a anemia manifestou-se na totalidade dos pacientes estudados. Observou-se uma associação significativa entre creatinina e ureia. **Conclusão:** O comprometimento da homeostase corporal, como também da capacidade física em pacientes DRC em hemodiálise, foi evidenciado.

Palavras-chave

Anemia; Testes laboratoriais; Diálise renal; Doença renal crônica

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é hoje considerada um problema mundial de saúde pública, devido ao aumento das suas taxas de morbimortalidade, no decorrer dos anos. A incidência de novos casos de DRC tem se elevado a cada ano e, em 2004, eram 59.153 pacientes com a doença; já, em 2007, esse número aumentou para 73.605.⁽¹⁾ Além disso, a *diabetes mellitus*, hipertensão arterial e glomerulonefrites mostraram-se relativamente interligadas com a DRC, sendo consideradas como fatores agravantes para o aparecimento da mesma.⁽²⁾

As manifestações clínicas da DRC surgem no momento em que o rim, o principal órgão responsável pela manutenção da homeostase corporal, tem inibida a produção e secreção de enzimas e hormônios, como, por exemplo, a 1,25-dihidroxitamina D, renina e eritropoetina, além da perda da filtração glomerular (FG), que proporciona o equilíbrio metabólico e hidroeletrólítico. A DRC é caracterizada exatamente pela diminuição progressiva e irreversível da função do órgão, no qual a FG fica tão compro-

metida que não consegue manter o equilíbrio da qual é responsável. Dessa maneira, afeta outros órgãos do corpo humano.⁽³⁾ Como consequência, observa-se a anemia como causa da síntese diminuída de eritropoiese, sendo caracterizada como normocítica e normocrômica.^(4,5) Somado a isso, inúmeros estudos relatam a forte associação entre a prevalência e intensidade da anemia com o estágio da doença renal.⁽⁶⁾

A progressão da DRC, ocasionada pela anemia, é considerada o fator que mais contribui para a sua prevalência.⁽⁷⁾ A redução do número de néfrons faz com que o processo de fibrose túbulo-intersticial das nefropatias crônicas piore, através do estresse oxidativo e da hipóxia. A anemia provoca efeitos deletérios nas células tubulares pela redução do potencial antioxidante do sangue, na vigência da geração aumentada de espécies reativas de oxigênio,⁽⁸⁾ o que caracteriza a síntese diminuída de eritropoetina pelo parênquima renal, levando a uma eritropoiese inadequada.⁽⁵⁾ Assim, a perda progressiva da capacidade de síntese renal do hormônio eritropoetina, o qual estimula a produção dos eritrócitos pela medula óssea, e a dimi-

¹Farmacêutica egressa da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Ijuí, RS.

²Fisioterapeuta. Doutora em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares (Chefe do Departamento de Ciências da Vida - DCVida da Unijuí)

³Acadêmica do curso de Fisioterapia da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ, bolsista Pibic/CNPq.

⁴Farmacêutico Mestre. Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ, Ijuí, RS.

nuição da sobrevivência das hemácias, nos pacientes, originam um quadro de anemia.^(9,10)

A anemia pode ser diagnosticada em qualquer estágio da DRC.⁽¹¹⁾ Atualmente, esse processo está sendo tratado com a administração de agentes estimulantes da eritropoiese, sendo a eritropoetina humana recombinante ou a alfaepoetina os fármacos mais utilizados, inclusive no Brasil, pois são considerados os de menor custo.^(9,12,13) A DRC, em seu estágio final, requer uma das modalidades de terapia renal substitutiva, como a hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal, para garantir a sobrevivência do paciente.⁽¹⁴⁾

Tendo em vista a incidência da anemia na DRC, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações nos exames laboratoriais e de capacidade funcional nos pacientes com DRC, submetidos à hemodiálise, estratificados por sexo. Tal avaliação inclui informações referentes ao eritrograma, bem como às dosagens bioquímicas da função renal dos pacientes e os fatores determinantes para o desenvolvimento da anemia na DRC.

MATERIAL E MÉTODOS

A população em estudo foi constituída de pacientes com DRC, submetidos à hemodiálise, em clínicas de nefrologia, no município de Ijuí, Rio Grande do Sul. Foram selecionados, para a amostra do estudo, os indivíduos com DRC, de ambos os sexos, hemodialíticos, clinicamente estáveis e sedentários.

O critério de exclusão da amostra foi a presença de insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, nos últimos três meses, doenças neuromusculares, patologias respiratórias agudas, asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica.

A anemia foi considerada quando a concentração de hemoglobina estava menor que 11 g/dL. Os dados para o presente estudo foram obtidos através de pesquisa institucional aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIJUÍ nº 297/2009.

O perfil dos indivíduos foi coletado a partir do prontuário médico e em entrevista direta com o avaliado. Foram coletados dados pessoais do indivíduo, histórico de fatores de risco, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes melitus* (DM), sedentarismo, tabagismo e etilismo, como, também, comorbidades associadas à doença renal crônica, além do tempo e frequência do tratamento hemodialítico.

Os dados referentes à avaliação laboratorial foram coletados a partir dos prontuários de cada paciente. Os exames laboratoriais foram realizados no laboratório de análises clínicas vinculado ao hospital no qual os pacientes realizam a hemodiálise.

Nos prontuários, constavam os seguintes parâmetros laboratoriais: albumina, cálcio, fósforo, produto cálcio-fósforo, hematócrito, hemoglobina, potássio, transaminase pirúvica (TGP), ureia.

Para avaliação da capacidade funcional máxima, os pacientes foram submetidos a um teste cardiopulmonar de exercício, em esteira rolante (Imbrasport, Porto Alegre, Brasil), com protocolo de rampa (velocidade inicial de 1 Km/h e final de 6 Km/h, inclinação inicial de 0% e final de 10%). Os gases expirados foram analisados a cada 20 segundos, através de um analisador de gases (*Total Metabolic Analysis System, TEEM 100*, Michigan, EUA), sendo o $VO_{2\text{pico}}$ definido como o mais alto valor alcançado, durante o teste, por 20 segundos.

Os dados foram processados no pacote estatístico *PASW Statistics Data Editor* (versão 18.0, Chicago, EUA). A análise descritiva foi apresentada como média \pm desvio padrão, frequência relativa e absoluta.

Para variáveis quantitativas, realizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, sendo que, para as não paramétricas, utilizou-se o teste U (Mann Whitney), para comparação entre as médias.

Nas variáveis qualitativas, utilizou-se o teste exato de Fischer. Para correlacionar variáveis não paramétricas, utilizou-se o teste de Spearman. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram avaliados 23 pacientes com DRC que realizam hemodiálise em uma unidade de hemodiálise do interior do estado do Rio Grande do Sul.

As características quanto à idade apresentaram valores similares em ambos os sexos. Na análise da média das variáveis antropométricas, peso, estatura, IMC, CA e CQ, o sexo masculino apresentou maior peso, estatura e CA, comparado ao feminino; o IMC exibiu valores similares e permitiu classificar ambos os sexos como sobre-peso.

A etiologia de doença mais prevalente foi a nefroesclerose, seguida da hipertensiva e diabética hipertensiva. O sedentarismo foi o principal fator de risco, seguido da HAS e DM (Tabela 1).

Na análise das variáveis sanguíneas, cabe ressaltar que 100% dos homens e mulheres avaliados apresentaram anemia. Na avaliação das médias do hematócrito, observou-se um valor mais elevado, no sexo feminino, e da glicose, no masculino. Os valores de hemoglobina, creatinina e ureia apresentaram valores similares, em ambos os sexos. O $VO_{2\text{pico}}$ foi maior no sexo masculino (Tabela 2).

Ao correlacionar as variáveis sanguíneas, como creatinina com hemoglobina, hematócrito e ureia; glicose com creatinina, hemoglobina e ureia e entre o $VO_{2\text{pico}}$ com hemoglobina e hematócrito, não se verificou correlação. A amostra apresentou diferença estatisticamente significativa somente quando se correlacionou a creatinina com a ureia ($p \leq 0,05$), embora tenha apresentado uma correlação fraca (Tabela 3).

Tabela 1 - Características clínicas e valores basais de pacientes com DRC submetidos a hemodiálise

	Masculino (n = 16)	Feminino (n = 7)	Total (n = 23)	P
Idade (anos)	58,81 ± 12,60	56,43 ± 3,73	58,09 ± 10,64	0,300£
Peso (kg)	75,67 ± 11,57	67,14 ± 11,48	73,09 ± 11,97	0,082£
Estatura (cm)	166,00 ± 6,09	156,43 ± 7,34	163,09 ± 7,76	0,008£
IMC (kg . m-2)	27,50 ± 3,95	27,43 ± 3,95	27,48 ± 3,86	0,840£
CA (cm)	99,75 ± 9,89	96,33 ± 11,64	98,82 ± 10,22	0,318£
CQ (cm)	98,44 ± 6,85	100,50 ± 10,21	99,00 ± 7,70	0,912£
Origem da DRC (%)				0,930†
Diabética e hipertensiva	2 (12,5)	1 (14,3)	3 (13,2)	-
Hipertensiva	2 (12,5)	1 (14,3)	3 (13,2)	-
Diabética	1 (6,3)	1 (14,3)	2 (8,7)	-
Litíase	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	-
Diabética obstrutiva	2 (12,5)	0 (0)	2 (8,7)	-
Obstrutiva	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	-
Glomerulonefrite	1 (6,3)	1 (14,3)	2 (8,7)	-
Síndrome nefrótica	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	-
Bexiga neurogênica	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	-
Doença policística do adulto	0 (0)	1 (14,3)	1 (4,3)	-
Nefrosclerose hipertensiva	4 (24,7)	1 (14,3)	5 (21,7)	-
Rins policísticos	0 (0)	1 (14,3)	1 (4,3)	-
FRCv n (%)				
Sedentarismo	15 (93,8)	6 (85,7)	21 (91,3)	0,526†
DM	6 (37,5)	2 (28,6)	8 (34,8)	1,000†
Tabagismo	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	0,101†
Etilismo	1 (6,3)	0 (0)	1 (4,3)	0,566†
HAS	13 (81,3)	6 (85,7)	19 (82,6)	1,000†

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica; DM = Diabetes Mellitus; FRCv = Fatores de Risco Cardiovasculares; CA = Circunferência Abdominal; CQ = Circunferência do Quadril; IMC = Índice de Massa Corporal; † = Teste Exato de Fischer; £ = Teste U - Mann Whitney; * = p ≤ 0,05, estatisticamente significativo

Tabela 2 - Hemoglobina, hematócrito, creatinina, ureia, glicose e VO_{2pico} de ambos os sexos

	Masculino	Feminino	Total	P
Hemoglobina (g/dL)	9,54 ± 1,72	9,94 ± 1,06	9,66 ± 1,54	0,738£
Hematócrito (%)	29,34 ± 5,08	31,8 ± 3,08	30,09 ± 4,64	0,270£
Creatinina (mg/dL)	9,10 ± 2,67	8,67 ± 1,75	8,96 ± 2,38	0,805£
Ureia (mg/dL)	160,63 ± 45,06	160,43 ± 39,97	160,57 ± 42,67	0,789£
Glicose (mg/dL)	95,50 ± 27,92	78,07 ± 26,25	90,20 ± 28,05	0,442£
VO _{2máx} (cmH ₂ O)	18,59 ± 5,87	16,90 ± 5,28	18,05 ± 5,60	0,568£

£ = Teste U - Mann Whitney

Tabela 3 - Correlação entre a creatinina com a hemoglobina, hematócrito e ureia e correlação entre a glicose com a creatinina, hemoglobina e ureia

	Creatinina(r/p)	Glicose(r/p)	VO _{2máx} (r/p)
Creatinina (mg/dL)	0/0	0,045/ 0,842	-
Hemoglobina (g/dL)	-0,316/0,153	-0,013/ 0,953	0,017/ 0,946
Hematócrito (%)	-0,351/0,110	-	0,226/0,353
Ureia (mg/dL)	0,588/0,004*	0,101/ 0,647	-

r = Correlação de Spearman; * = p ≤ 0,05, estatisticamente significativo

DISCUSSÃO

Dos 23 pacientes avaliados, a maioria era do sexo masculino. O predomínio do sexo masculino na população do estudo é semelhante aos resultados encontrados no Censo de 2004, no qual 57,7% das pessoas, em hemodiálise eram do sexo masculino. Quanto à faixa etária, prevaleceu a idade acima dos 50 anos, como relatado no estudo de Ribeiro.⁽¹⁵⁾ Segundo Chaves,⁽¹⁶⁾ há uma prevalência de pacientes hemodialíticos na faixa etária superior aos 50 anos, devido aos efeitos debilitantes da idade e de outras comorbidades associadas.

Na análise da média das variáveis antropométricas, peso, estatura, IMC, CA e CQ, o sexo masculino apresentou maior peso, estatura e CA, comparado ao feminino. Todavia, o IMC apresentou valores similares e ambos os sexos foram classificados como sobrepeso. Na avaliação destes resultados, observou-se que, dentro da população estudada, as pacientes do sexo feminino apresentam-se com um melhor quadro no que diz respeito às variáveis antropométricas. Importa ressaltar que o acúmulo de gordura visceral é sempre associado a complicações cardiovasculares, sendo o sexo masculino o de maior risco. Em geral, a prevalência de obesidade vem aumentando na população com doença renal crônica.⁽¹⁷⁾ De modo geral, valores indicativos de sobrepeso e obesidade avaliados pelo IMC estão presentes em cerca de 50% a 60% dos pacientes, na fase não dialítica, e 40% a 60% dos pacientes, em diálise peritoneal, e, em uma menor proporção, nos pacientes em hemodiálise (20% a 30%).⁽¹⁸⁾ Um estudo, incluindo 1.669 pacientes, na fase não dialítica, relatou que, enquanto o IMC elevado se mostrava protetor, valores elevados da razão cintura/quadril estavam associados com um maior risco de eventos cardiovasculares, num período de dez anos.⁽¹⁹⁾

Há vários anos, a presença de comorbidades é considerada a mais importante determinante de sobrevida e morbidade em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.⁽²⁰⁻²²⁾ Neste estudo, em relação às patologias, 21,7% dos avaliados apresentavam nefrosclerose hipertensiva, 13,2% eram hipertensos e 8,7% eram diabéticos. Analisando-se a doença de base, observou-se, no estudo de Ribeiro et al.,⁽¹⁵⁾ Biavo et al.⁽²³⁾ e Pereira et al.⁽²⁴⁾ e dados nacionais,⁽²⁵⁾ que a nefrosclerose apresentava-se como a principal doença prévia, seguida pela DM. Além disso, outras doenças crônicas não transmissíveis, como a HAS, têm sido consideradas tanto como predisponentes ao quadro de nefropatia quanto como um fator de risco/agravamento no quadro dos pacientes em hemodiálise.⁽²⁶⁻³⁰⁾

Conforme a Tabela 2, o presente estudo evidenciou que existe uma forte relação entre a DRC e a anemia, tendo em vista todos os pacientes estudados apresentarem anemia. O fato dos homens possuírem as menores médias hemoglobínicas/hematócrito e apresentarem as maiores médias de creatinina, comprova que o processo de insuficiência renal crônica provoca anemia na mesma proporção

em que os rins vão perdendo sua função. Além disso, a avaliação hematológica associada às variáveis antropométricas demonstraram que a população masculina avaliada apresenta maior peso e CA, associadas a um quadro anêmico mais grave quando comparado ao sexo feminino. Observou-se, também, que a média de glicose foi maior no sexo masculino, assim como a creatinina, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Segundo Stein, Eick & Irigoyen⁽³¹⁾ e Passos, Barreto & Lima-Costa,⁽³²⁾ os homens decrescem mais rapidamente a função renal do que as mulheres, devido a inúmeros fatores, tais como aspectos antropométricos, estilo de vida, quadro de hipertensão e valores normalmente mais altos de creatinina, glicose e ureia.^(33,34) Neste estudo, não houve diferença estatística, mas cabe ressaltar que glicose e creatinina apresentaram-se mais elevadas no sexo masculino.

A Tabela 2 mostra, ainda, que os pacientes deste estudo apresentaram $VO_{2\text{pico}}$ inferior a 20 ml/kg/min. Estudos como o de Coelho et al.,⁽³⁵⁾ realizados em crianças e jovens com DRC, também mostraram valores inferiores a 20 ml/kg/min. Sietsema et al.⁽³⁶⁾ concluíram que valores de $VO_{2\text{máx}}$ maiores de 17,5 ml/kg/min são preditores fortes e importantes de sobrevida de pacientes com DRC, demonstrando que a avaliação da capacidade de exercício é essencial no acompanhamento dos indivíduos com DRC. A tolerância aos exercícios, medida pelo consumo de oxigênio, obtida nos pacientes urêmicos, tem sido muito inferior à esperada nos indivíduos sedentários normais, isto porque pacientes com doença renal crônica, em programa de hemodiálise, têm incapacidade física que lhes limita o desempenho de atividades diárias.^(37,38)

O principal achado deste estudo situa-se no fato de que todos os pacientes em tratamento hemodialítico apresentaram anemia. Isto pode ser explicado porque a DRC é uma situação inflamatória que interfere na síntese e ação de eritropoetina, cursando com a elevação sérica de inúmeros marcadores de inflamação, como, por exemplo, a proteína C reativa, haptoglobina, 1-glicoproteína-ácida e diversas interleucinas pró-inflamatórias.⁽³⁹⁾ Este quadro tem um efeito antiapoptótico nas células precursoras de hemácias, na medula óssea, por inibir as vias das caspases e as interleucinas pró-inflamatórias, que conduzem essas células à morte, promovendo uma redução no número de eritrócitos circulantes e, conseqüentemente, gerando anemia.⁽⁴⁰⁾

Segundo as Diretrizes Brasileiras para Doença Renal Crônica⁽⁴¹⁾ e a *National Kidney Foundation*,⁽⁴²⁾ a anemia parece contribuir para a piora do processo de fibrose túbulo-intersticial das nefropatias crônicas, através do estresse oxidativo e da hipóxia, fazendo com que o potencial antioxidante do sangue diminua na vigência de espécies reativas de oxigênio, acarretando efeitos deletérios às células tubulares.⁽⁷⁾

A anemia, sendo uma grave consequência na insuficiência renal crônica, causada, principalmente, pela produção

insuficiente de eritropoetina, é classificada em normocítica e normocrômica. Ela provoca incapacidade física e mental e é responsável pela redução da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes. A anemia estigmatiza o paciente com doença renal crônica, pois produz palidez cutânea, transmitindo um aspecto de enfermidade aos indivíduos, prejudicando a sua inserção social.^(2,5)

Observando a Tabela 3, é possível evidenciar que não houve correlação da hemoglobina com a creatinina, diferentemente do estudo de Canzian et al.,⁽⁴³⁾ onde as mesmas se correlacionaram. Pode-se observar que os valores do hematócrito também não foram significativos com a creatinina. A relação de creatinina com ureia foi significativa, já que, quando ocorre uma elevação da creatinina, observa-se que a ureia também aumenta.

Na Tabela 3, os dados de correlação entre glicose e creatinina não se mostraram estatisticamente significativos. O mesmo observou-se em relação à hemoglobina e à ureia. Segundo Coresh et al.,⁽⁴⁴⁾ Levin,⁽⁴⁵⁾ Crook, Washington & Flack⁽⁴⁶⁾ e Brown et al.,⁽⁴⁷⁾ a DRC pode cursar de forma assintomática e a creatinina sérica elevada é comum, mas raramente descrita para segmentos populacionais de não hipertensos, não diabéticos e sem disfunção renal, o que não significa ausência de patologia associada. No estudo de Lessa,⁽⁴⁸⁾ realizado em Salvador, observou-se uma associação positiva, mas não significativa, entre diabetes e creatinina elevada.

Na doença renal crônica, a perda dos glóbulos vermelhos pode ser ocasionada pela hemólise, a qual pode originar uma grave anemia, que apresentará uma relação forte com a patologia de base, a DRC. Dessa forma, quanto maior a disfunção renal, maior a deficiência na produção de eritropoetina, aumento da hipoproliferação dos eritrócitos e, conseqüentemente, da anemia. Estudos anteriores mostram que os níveis de eritropoetina são elevados em pacientes anêmicos urêmicos; isso se deve ao comprometimento da função do néfron, principal componente do rim, responsável pela secreção da mesma.⁽⁴⁹⁾

O estudo de Madore et al.⁽⁵⁰⁾ mostra que a causa de anemia em pacientes em hemodiálise é complexo e multifatorial. Mesmo sabendo que na anemia é predominante a falta de produção de eritropoetina, pelo rim doente, identificaram-se outros importantes fatores que devem ser levados em consideração, como a desnutrição proteico-energética, deficiência de ferro e a própria hemodiálise, que merecem atenção devido ao seu impacto potencial sobre a anemia.

A anemia tem um impacto significativo na sobrevida dos pacientes, embora de menor magnitude estatística do que outros fatores de morte, tais como as concentrações séricas de albumina e de creatinina e da dose administrada de hemodiálise.⁽⁵¹⁾

Portanto, a correção da anemia pode ser um meio relativamente simples de melhorar a probabilidade de sobrevida para pacientes em diálise.

CONCLUSÃO

Por sua incidência e prevalência, a doença renal crônica vem aumentando progressivamente a cada ano, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade. Nas análises realizadas avaliaram-se os marcadores bioquímicos que auxiliam na detecção da doença renal crônica e sua monitorização. Através dos valores encontrados e comparados com os valores dados como de referência, obteve-se uma representação de que os números encontrados nos pacientes renais crônicos são, na maioria das vezes, elevados, e, em alguns casos, mostraram-se exorbitantes.

A anemia manifestou-se presente na totalidade dos pacientes portadores da doença renal crônica, sendo uma das manifestações mais frequentes nesses pacientes, devido à deficiência de produção da eritropoetina, como causa principal da própria disfunção renal. Uma maior atenção deve ser dada na correção dessa condição, visto que alguns estudos sugerem que a correção da anemia pode diminuir a velocidade de progressão da DRC, além do impacto inquestionável na condição cardiovascular desses indivíduos.

As intervenções para diminuir ou reverter a progressão da doença renal e prevenir a ocorrência de falhas da função do órgão terão maior eficiência se forem mais implementadas precocemente. É sempre oportuno ressaltar que o sucesso terapêutico da doença primária também é muito importante, na prevenção da falência renal.

Abstract

Objective: To evaluate the changes in laboratory tests and functional capacity in patients with chronic kidney disease (CKD) undergoing hemodialysis. **Methods:** For the evaluation of patients were collected personal data, risk factors history and comorbidities associated with CKD, as well as time and frequency on hemodialysis, besides the results of laboratory tests and functional capacity. **Results:** 21,7% of the 23 patients studied had a nephrosclerosis as the main cause of CKD. The sedentary was presented as the main risk factor. All patients had changes in laboratory test results and functional capacity, and anemia manifested in all studied patients. The significant association between creatinine and urea was observed. **Conclusion:** Thus became evident impairment of body homeostasis as well as physical ability in CKD patients on hemodialysis.

Keywords

Anemia; Laboratory tests; Renal dialysis; Chronic kidney disease

REFERÊNCIAS

- Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(12):2753-8.
- Sociedade Brasileira de Nefrologia. Insuficiência renal crônica. 2008. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br>>. Acesso em: 25 de abril de 2012.
- Cunha MS, et al. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida em pacientes renais crônicos submetidos a tratamento hemodialítico. *Fisioterapia e Pesquisa.* 2009;16 (12): 155-60.

4. Draczevski L & Teixeira LM. Avaliação do perfil bioquímico e parâmetros hematológicos em pacientes submetidos à hemodiálise. *Revista Saúde e Pesquisa*. 2011;4(1):15-22.
5. Abensur H. Anemia da doença renal crônica: diretrizes brasileiras de doença renal crônica. *J Bras Nefrol*. 2004;26(3):26-8.
6. Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int*. 2004;66(92):753-60.
7. Rossert JA, McClellan WM, Roger SD, Verbeelen DL, Hörl WH. Contribution of anaemia to progression of renal disease: a debate. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 1:60-6.
8. Deferrari R. Suplementação de ferro em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise: um ensaio clínico. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. 2002;20(3):202-12.
9. Bastos MG. Anemia e progressão da doença renal crônica. *J Bras Nefrol*. 2006;28(3 Supl. 2):S18-21.
10. Duh MS, Weiner JR, White LA, Lefebvre P, Greenberg PE. Management of anaemia: a critical and systematic review of the cost effectiveness of erythropoiesis-stimulating agents. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(2):99-120.
11. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 226, de 10 de maio de 2010. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da anemia na insuficiência renal crônica. *Diário Oficial da União*, 28 ago. 2010.
12. Ammirati AL, et al. Variações nos níveis de hemoglobina de pacientes em hemodiálise tratados com eritropoetina: uma experiência brasileira. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56:209-13.
13. Locatelli F, Pisoni RL, Combe C, Bommer J, Andreucci VE, Piera L, et al. Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(1):121-32. Erratum in *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(6): 1666.
14. Bastos MG, et al. Doença renal crônica: problemas e soluções. *J Bras Nefrol*. 2004;26:202-15.
15. Ribeiro RCHM, et al. - Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do estado de São Paulo. *Acta Paul Enferm*, 21(Número Especial). 2008; 207-11.
16. Chaves LDP, et al. Estudo da sobrevida de pacientes submetidos a hemodiálise e estimativa de gastos no município de Ribeirão Preto - SP. *Rev Esc Enferm*. 2002;36(2):193-9.
17. Kramer HJ, Saranathan A, Luke A, Durazo-Arvizu RA, Guichan C, Hou S, et al. Increasing body mass index and obesity in the incident ESRD population. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1453-9.
18. Cuppari L & Kamimura MA. Avaliação nutricional na doença renal crônica: desafios na prática clínica. *J Bras Nefrol*. 2009;31(Supl. 1):28-35.
19. Elsayed EF, Tighiouart H, Weiner DE, Griffith J, Salem D, Levey AS, et al. Waist-to-hip ratio and body mass index as risk factors for cardiovascular events in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(1):49-57.
20. Locatelli F, Del Vecchio L, Manzoni C. Morbidity and mortality on maintenance haemodialysis. *Nephron*. 1998;80(4):380-400.
21. Beddhu S, Bruns FJ, Saul M, Seddon P, Zeidel ML. A simple comorbidity scale predicts clinical outcomes and costs in dialysis patients. *Am J Med*. 2000;108(8):609-13.
22. Davies SJ, Phillips L, Naish PF, Russell GI. Quantifying comorbidity in peritoneal dialysis patients and its relationship to other predictors of survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(6):1085-92.
23. Biavo BMM, et al. Aspectos nutricionais e epidemiológicos de pacientes com doença renal crônica submetidos a tratamento hemodialítico no Brasil. *J Bras Nefrol*. 2012;34(3):206-15.
24. Pereira AC, et al. Associação entre fatores de riscos clínicos e laboratoriais e progressão da doença renal crônica pré-dialítica. *J Bras Nefrol*. 2012;34(1):68-75.
25. Romão Júnior JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol*. 2004;26:1-3.
26. Dasgupta I, Madeley RJ, Pringle MA, Savill J, Burden RP. Management of hypertension in patients developing end-stage renal failure. *QJM*. 1999;92(9):519-25.
27. Motta TV. Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações. 4. ed. Ed. Robe, 2003. 262p.
28. Pinheiro M E & Alves CMP. Hipertensão arterial na diálise e no transplante renal. *J Bras Nefrol*. 2003;25(3):142-8.
29. Thomé FS. et al. Doença renal crônica. In: Barros E, et al. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. cap. 24. p. 381-404.
30. Barreto ACP, Santello JL. Manual de hipertensão: entre a evidência e a prática clínica. São Paulo: Lemos Editorial, 2002. cap. 9. p. 137-9.
31. Stein AC, Eick R & Irigoyen MC. HAS e insuficiência renal em mulheres: a evolução é diferente dos homens? *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*, 15:1-4, 2008.
32. Passos VM, Barreto SM, Lima-Costa MF. Detection of renal dysfunction based on serum creatinine levels in a Brazilian community: the Bambuí health and ageing study. *Braz J Med Biol*. 2003;36:393-401.
33. Jones CA, McQuillan GM, Kusek JW, Eberhardt MS, Herman WH, Coresh J, et al. Serum creatinine levels in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 1998;32(6):992-9.
34. Fried LF, Shlipak MG, Crump C, Bleyer AJ, Gottdiener JS, Kronmal RA, et al. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(8):1364-72.
35. Coelho CC et al. Repercussões da insuficiência renal crônica na capacidade de exercício, estado nutricional, função pulmonar e musculatura respiratória de crianças e adolescentes. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(1):1-6.
36. Sietsema KE, Amato A, Adler SG, Brass EP. Exercise capacity as a predictor of survival among ambulatory patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2004;65(2):719-2.
37. Gutman RA, Stead WW, Robinson RR. Physical activity and employment status of patients on maintenance dialysis. *N Engl J Med*. 1981;304(6):309-13.
38. Sagiv M, Rudoy J, Rotstein A, Fisher N, Ben-Ari J. Exercise tolerance of end-stage renal disease patients. *Nephron*. 1991; 57(4):424-7.
39. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.
40. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 1999;401 (6752):489-93.
41. Diretrizes Brasileiras para Doença Renal Crônica. *J Bras Nefrol*. 2004;26(Supl. 1):1-87.
42. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
43. Canziani MEF. et al. Deficiência de ferro e anemia na doença renal crônica. *J Bras Nefrol*. 2006;28(2):86-90.

44. Coresh J, Wei GL, McQuillan G, Brancati FL, Levey AS, Jones C, et al. Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med.* 2001;161(9):1207-16.
45. Levin A. Identification of patients and risk factors in chronic kidney disease: evaluating risk factors and therapeutic strategies. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 7:57-60.
46. Crook ED, Washington DO, Flack JM. Screening and prevention of chronic kidney disease. *J Natl Med Assoc.* 2002;94(8 Suppl):55S-62S.
47. Brown WW, Peters RM, Ohmit SE, Keane WF, Collins A, Chen SC, et al. Early detection of kidney disease in community settings: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am J Kidney Dis.* 2003 Jul;42(1):22-35.
48. Lessa I. Níveis séricos de creatinina: hipercreatininemia em segmento da população adulta de Salvador, Brasil. *Brasil. Rev. bras. epidemiol.* [online]. 2004;7(2):176-86.
49. Radtke HW, Claussner A, Erbes PM, Scheuermann EH, Schoeppe W, Koch KM. Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure: relationship to degree of anemia and excretory renal function. *Blood.* 1979;54(4):877-84.
50. Madore F, Lowrie EG, Brugnara C, Lew NL, Lazarus JM, Bridges K, et al. Anemia in hemodialysis patients: variables effecting the outcome predictor. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(12):1921-9.
51. Lowrie E, Lew N. Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis.* 1990;15(5): 458-82.

Correspondência

Eliane Roseli Winkelmann

*Departamento de Ciências da Vida-DCVida
Universidade Regional do Noroeste do Estado do
Rio Grande do Sul – UNIJUÍ
Rua do Comércio, nº 3000, Bairro Universitário
98700-000 – Ijuí, RS
e-mail: elianew@unijui.edu.br*

Avaliação da qualidade do DNA obtido de amostras preservadas em parafina

Quality evaluation of DNA from samples preserved in paraffin

Diego Marques da Costa Santos¹

Ananília Medeiros Gomes da Silva¹

Caroline Nóbrega Bernardino¹

Anatália Ribeiro¹

Bruna Lima de Oliveira¹

Isabelle Cristina Clemente dos Santos¹

Jéssica Cavalcante dos Santos¹

Jéssica Nayara Góes de Araújo²

André Ducati Luchessi^{3,4}

Vivian Nogueira Silbiger^{3,4}

Resumo

A obtenção de um material genético íntegro e com concentrações satisfatórias para a amplificação de uma determinada sequência são os principais desafios para o processamento de amostras de tecido preservados em parafina. O presente estudo teve como objetivo comparar três diferentes protocolos de extração de DNA que têm em comum entre si o princípio de extração por sílica-gel. Vinte e sete amostras de tecidos tireoidianos preservados em parafina foram processadas por meio de cortes em triplicata de 20 µm. O método A utilizou três horas na etapa de digestão do tecido, os métodos B e C utilizaram 16 horas para a digestão, sendo que o último utilizou diferentes solventes para reidratar o tecido e solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, para purificação. Todos os métodos utilizaram em comum o conjunto de reagentes QIAamp DNA mini Kit. Na comparação entre as concentrações obtidas de DNA, o método B apresentou maior média (3,7 ng/µL); já o método A obteve valor médio de 1,2 ng/µL e o método C, de 0,7 ng/µL. Todos os protocolos obtiveram valores da relação 260/280 e 260/230 fora dos valores de referência esperado, evidenciando uma perda na qualidade do DNA extraído. O resultado da integridade do DNA, por meio da eletroforese em gel de agarose, também demonstrou o alto grau de degradação de todos os métodos analisados. Entretanto, foi possível realizar a genotipagem do polimorfismo 174G>C do gene da interleucina 6 em 100% das amostras testadas, para o método C, e 66%, para o método A e B. O método C foi o mais reprodutivo para genotipagem, apesar do maior custo e tempo de processamento, sendo este o método mais indicado para a implementação na rotina laboratorial de biologia molecular para amostras preservadas em parafina.

Palavras-chave

Preservação em parafina; Biologia molecular; DNA; PCR

INTRODUÇÃO

Os tecidos fixados em formalina e embebidos na parafina trouxeram para a citopatologia uma significativa inovação no diagnóstico, no tratamento e no prognóstico de doenças.⁽¹⁻³⁾

O arquivamento de espécimes de tecido parafinado tem como principal vantagem a conservação da morfologia, por longos períodos, possibilitando a realização de inúmeros estudos retrospectivos,^(1,3,4) como é o caso de infecções causadas pelo HPV,⁽⁵⁾ de infecções fúngicas^(6,7) e até mesmo para estudos oncológicos.

Devido ao enorme progresso na patologia molecular, durante a última década, as técnicas moleculares deixaram

de ser utilizadas unicamente ao nível de pesquisa e passaram a ser aplicadas na rotina do diagnóstico laboratorial.⁽⁴⁾

Um grande desafio para a extração do DNA de tecidos embebidos em parafina e fixados em formalina é a obtenção de um material de boa qualidade para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em geral, o material genético obtido é escasso e degradado. Muitas vezes contém vestígios de substâncias que inibem a reação de amplificação, tais como a formalina, ou que inibem a proteinase K, usada durante o processo de obtenção do material genético, tal como o xileno.^(1,8,9)

A ligação entre as proteínas e as bases de nucleotídeos é um dos fatores que impossibilita a amplificação de um

¹Graduação de Farmácia, UFRN, Natal, RN, Brasil.

²Graduação de Biomédicina, UFRN, Natal, RN, Brasil.

³Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

⁴Docente da Graduação de Farmácia, UFRN, Natal, RN, Brasil.

Artigo recebido em 01/06/2014

Artigo aprovado em 20/11/2014

Conflito de interesses: sem conflito de interesse

Suporte financeiro: Este estudo teve o suporte dos subsídios a partir do FAPERN (EDITAL PPPIV 005/2011).

determinado gene, devido à utilização da formalina na fixação.⁽¹⁾ Isto ocorre em função de uma série de reações eletrofilicas e catiofilicas decorrentes da presença da formalina.^(1,3,4)

O aumento da degradação do DNA, durante o armazenamento, ocorre quando não há controle do pH da formalina a 10%.^(1,10) Isto acontece devido às reações consecutivas de troca de elétrons, o que resulta na quebra da ligação fosfodiéster e, por consequência, na quebra da fita do DNA.⁽¹⁾

Além das variantes presentes durante o processo de preparo do bloco, que pode vir a interferir na qualidade do DNA, há variabilidades histopatológicas presentes em cada tecido a ser extraído, o que pode determinar as peculiaridades dos métodos e a necessidade de padronização dos protocolos.⁽¹¹⁾

Desta forma, este estudo se propôs a comparar três diferentes protocolos de obtenção de DNA, a partir de tecido parafinado, que utilizam o conjunto de reagentes da *QIAamp DNA mini Kit* (Qiagen® Biotecnologia Brasil Ltda. São Paulo, Brasil), através da extração por sílica-gel, para avaliar qual o melhor método de obtenção do material genético de amostras de pacientes com câncer de tireoide, uma neoplasia de elevada frequência no Brasil e no mundo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na unidade "Hospital Dr. Luiz Antônio" da Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer (LNRCC), situado na cidade de Natal, Rio Grande do Norte.

Para este estudo, foram obtidos tecidos tireoidianos emblocados em parafina de 27 pacientes do acervo de blocos da LNRCC, no período de 2003 a 2011, que foram previamente fixados com formalina a 10% e tiveram o diagnóstico de neoplasia tireoidiana confirmada por histopatologia. Uma vez confirmado o diagnóstico do paciente, foram selecionados apenas os blocos que apresentavam ausência de lesão, para a realização do presente estudo.

Foram realizados cortes histológicos em triplicata biológica, confeccionando-se blocos de 20 µm que possuíam apenas tecido tireoidiano com ausência de neoplasia, através de micrótomo rotativo semiautomático (modelo YD-335, São Paulo, Brasil) e armazenados em tubos do tipo *ependorf* estéril.

A fim de evitar contaminação entre as amostras, foi utilizada uma navalha descartável de Alto Perfil (modelo 818, marca Leica, Alemanha), para executar cortes histológicos nos blocos de cada paciente.

Para cada amostra, foi atribuído um código para a preservação do anonimato durante o processamento do material biológico e elaboração dos dados estatísticos. A amostra coletada foi armazenada em temperatura ambiente até a extração do material genético no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Neste estudo, foram escolhidos três protocolos que utilizavam o conjunto de reagentes da *QIAamp DNA mini Kit*, com suas adaptações para extração de DNA de tecidos emblocados em parafina previamente fixados com formalina a 10%: Simonato e Miyahara;⁽¹²⁾ Prince et al.;⁽¹³⁾ Farrugia et al.⁽²⁾ Estes trabalhos foram denominados como A, B e C, respectivamente. As extrações foram executadas em triplicatas, isto é, em três dias diferentes, sendo que em cada dia utilizaram-se amostras de três pacientes em triplicata.

O protocolo A utilizava duas lavagens com 1.000 µl de xilol e, posteriormente, mais duas lavagens de 1.000 µl de etanol absoluto do sedimento para a remoção da parafina do tecido. Entre cada troca de solvente foi realizada uma homogeneização em agitador tipo vórtex, por 15 segundos, e uma centrifugação, a 14.000 rpm, por 5 minutos. Ao final destes procedimentos, o microtubo foi submetido a uma centrifugação a 14.000 rpm, por 5 minutos, e teve o sobrenadante descartado. Os tubos foram incubados em banho-maria, a 37°C, durante 15 minutos, com as tampas abertas, com objetivo de evaporar o etanol remanescente. Após remoção da parafina, foram seguidas as recomendações do fabricante para o conjunto de reagentes da *QIAamp DNA mini Kit*, alterando apenas o tempo de incubação do tecido com 20 µL da proteinase K (20 mg/mL) [Qiagen® Biotecnologia Brasil Ltda. São Paulo, Brasil], durante 3 horas, a 56°C, com uma breve homogeneização, a cada hora, e a etapa de eluição.

O protocolo B seguiu os mesmos procedimentos descritos no protocolo A para a retirada da parafina do tecido, diferenciando-se exclusivamente no tempo de incubação do tecido com proteinase K, por 16 horas, a 56°C.

Por fim, o protocolo C, cuja remoção da parafina dos cortes histológicos foi realizada através de duas lavagens com 1.000 µl de xilol, incubando-se o tecido à temperatura ambiente, por 10 minutos, após a aplicação deste solvente. O material foi submetido a diferentes concentrações de álcool, inicialmente com etanol absoluto, a 95% e a 70%, e duas lavagens com água. As amostras foram reidratadas com uma solução de Tris/EDTA (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5) e incubadas, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionada uma solução tampão de Tris (Tris 10 mM, pH 7,5) por 20 horas, a 58°C. Foram utilizados 1.000 µL destes solventes e, na troca de cada solvente, foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. Após remoção da parafina, o tecido sofreu o processo de digestão com 20 µL de proteinase K, por 16 horas, a 56°C. Em seguida, foram adicionados 1.000 µL do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (v:v:v, 25:24:1), homogeneizado vigorosamente, por 15 segundos, e procedida uma centrifugação de 14.000 rpm, por 1 minuto. A fase superior foi retirada e utilizada conforme as recomendações do fabricante, para o conjunto de reagentes da *QIAamp DNA mini Kit*, alterando-se apenas a etapa de eluição.

Na etapa de eluição do DNA, foram acrescentados 100 µL do tampão de eluição fornecido pelo fabricante nos

filtros. Após 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados a 8.000 rpm e o filtrado foi reaplicado no filtro e incubado, novamente, por 10 minutos, e centrifugado a 8.000 rpm. Esta etapa foi comum a todos os três protocolos.

A quantificação do DNA obtido foi determinada por meio do fluorímetro *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), a fim de se avaliar a concentração de ácidos nucleicos não degradados. A quantificação realizada no *NanoVue Plus™ UV/Visible Spectrophotometer* (GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK) foi determinada por meio da absorbância dos ácidos nucleicos (260 nm).

A avaliação do grau de pureza foi feita através da relação 260/280 e 260/230, obtidos por meio da absorbância do material genético (260 nm), da absorbância das proteínas (280 nm) e dos eventuais resíduos de solventes orgânicos que podem interferir na amplificação do material genético (230 nm). Estes valores foram obtidos pelo equipamento *NanoVue Plus*.

A integridade do DNA foi avaliada através da análise de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 100 volts, 60 mA, no período de 20 minutos. O revelador utilizado foi o *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in DMSO* (Biotium Inc., Hayward, CA).

Foram escolhidas amostras aleatórias que representavam cada metodologia de extração, para submeter à discriminação alélica, por meio do sistema de detecção de sondas do tipo *TaqMan®*, pela PCR em tempo real, no equipamento *Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, California, EUA), a fim de demonstrar a viabilidade das amostras, para estudos de genotipagem. Neste intuito, elegeu-se um ensaio disponível no laboratório para esta etapa, o polimorfismo da interleucina 6 - 174G>C.

Os iniciadores e sondas foram traçados com o auxílio do programa *Primer Express® Software v 3.0* (Applied Biosystems, EUA). O iniciador sense e antissense foram, respectivamente: 5'-ACGACCTAAGCTGCACTTTTCC-3' e 5'-ATTGTGCAATGTGACGTCCTTT-3'. A sonda 1 e 2 foram, respectivamente: 5'-FAM-CTAGTTGTGTCTTGCCATG-MGB-3' e 5'-VIC-TAGTTGTGTCTTGCGATG-MGB-3'. A sonda 1 foi marcada com o fluoróforo FAM, identificando o alelo selvagem G. A sonda 2 foi marcada com o fluoróforo VIC, identificando o alelo mutante C.

O conjunto de reagentes utilizados para a PCR foi o *Applied Biosystems Taqman® Universal Master Mix II With UNG* (Life Technologies, California, EUA) e foram seguidas as recomendações do fabricante para estas reações (Produto da amplificação de 67 pares de bases).

Os softwares usados para a elaboração do relatório técnico foram: *Microsoft Office Excel 2000*, para o gerenciamento do banco de dados, e o *Statistical Package for the Social Science v. 15.0* (SPSS Inc., Illinois, EUA), para a execução dos cálculos estatísticos.

Antes de se efetuarem os testes de comparações das variáveis contínuas, foram avaliados os dados que seguem uma distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney quando o objetivo foi testar a hipótese de que os dois protocolos de extração têm a mesma distribuição. Para comparações entre mais de dois protocolos de extração, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (*p*-value) foram inferiores a 0,05.

ÉTICA

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer, sob o parecer nº 558 788.

RESULTADOS

Foram obtidas 27 amostras em triplicatas para a análise, sendo que, destas, 16 foram embocadas em 2011, cinco em 2010, uma em 2009, duas em 2008, duas em 2004 e uma em 2003. O Laboratório de Patologia passou a adotar o controle da solução tampão de formalina a 10% a partir do ano de 2010. Entretanto, não houve diferença significativa ao se compararem os resultados das concentrações de DNA, entre os anos, independente do protocolo de extração ($p=0,05$ e $p=0,08$ para concentrações obtidas pelo *NanoVue* e *Qubit*, respectivamente, para o teste de Kruskal-Wallis).

A reprodutibilidade técnica dos protocolos propostos foi avaliada através das triplicatas biológicas, em três dias diferentes. Não houve diferenças significativas entre as médias das concentrações de DNA de cada dia, para os resultados obtidos, por espectrofotômetro e fluorômetro, para o protocolo proposto por Farrugia e colaboradores ($p=0,38$ e $p=0,51$, respectivamente). Esses resultados são mostrados na Tabela 1.

Comparando-se as médias dos parâmetros de rendimento entre os três protocolos de extração, observou-se que houve diferenças significativas nas concentrações de DNA obtidas pelo *NanoVue* e *Qubit* ($p<0,001$ para o teste de Kruskal-Wallis, para ambos os resultados de quantificação). A Tabela 2 apresenta esses resultados.

O protocolo B obteve maior concentração de ácidos nucleicos do que o A e o C, ainda que as relações 260/280 e 260/230 estejam abaixo do esperado em todos os três protocolos, uma vez que consideram-se DNA puro valores destas relações entre 1,8-1,99 e 2,0-2,2, respectivamente. A baixa qualidade do material extraído pode ser confirmada através da visualização do gel de integridade na Figura 1.

Apesar da integridade do material genético estar comprometida, foi questionado se isto impediria a amplificação de pequenos fragmentos do DNA (67pb) e a detecção de

polimorfismos de um único nucleotídeo. Neste intuito, foi selecionada uma amostra aleatória de cada triplicata técnica, por protocolo, para serem submetidas à discriminação alélica, através do sistema de detecção de sondas do tipo TaqMan® pela PCR em tempo real.

Tabela 1 - Avaliação das concentrações obtidas das triplicatas técnicas de acordo com os três protocolos propostos

Dia	NanoVue			Qubit	
	[] ng µL	260/280	260/230	[] ng µL	
A ^I	1	172,5 ± 136,7 (26 - 377)	1,4 ± 0,4 (1,1 - 2,4)	0,4 ± 0,2 (0,13 - 0,72)	1,84 ± 0,8 (0,84 - 3,05)
	2	120,43 ± 184,1 (5,2 - 457)	1,8 ± 0,6 (1,1 - 2,58)	0,4 ± 0,3 (0,18 - 0,75)	1,31 ± 1,3 (0,11 - 3,56)
	3	317,3 ± 205,7 (104 - 759)	1,17 ± 0,1 (1,02 - 1,4)	0,6 ± 0,2 (0,3 - 0,85)	0,4 ± 0,16 (0,22 - 0,65)
B ^{II}	1	328,2 ± 193,4 (45 - 711)	1,17 ± 0,1 (1,05 - 1,37)	0,7 ± 0,2 (0,31 - 0,88)	7,68 ± 6,02 (2,99 - 22,8)
	2	299,9 ± 176,7 (13,7 - 568,5)	1,21 ± 0,3 (1,03 - 1,89)	0,7 ± 0,14 (0,45 - 0,84)	1,00 ± 0,73 (0,29 - 2,51)
	3	325,4 ± 137,8 (95,5 - 477,5)	1,16 ± 0,1 (1,06 - 1,4)	0,7 ± 0,2 (0,33 - 0,81)	2,39 ± 2,53 (1,1 - 9,03)
C ^{III}	1	48,3 ± 111,3 (7,5 - 345)	1,58 ± 0,2 (1,1 - 1,77)	0,7 ± 0,2 (0,45 - 0,86)	0,76 ± 0,33 (0,38 - 1,39)
	2	14,7 ± 5,3 (9,1 - 26,5)	1,43 ± 0,2 (1,06 - 1,58)	0,6 ± 0,11 (0,42 - 0,74)	0,57 ± 0,3 (0,29 - 1,06)
	3	115,4 ± 306,2 (9,9 - 932)	1,44 ± 0,3 (0,99 - 1,77)	0,6 ± 0,2 (0,35 - 1)	0,66 ± 0,4 (0,22 - 1,47)

Nota: Dados apresentados em média, desvio padrão e entre parênteses mínimo e máximo. A, protocolo proposto por Simonato e Miyahara ⁽¹²⁾; B, protocolo proposto por Prience et al ⁽¹³⁾; C, protocolo proposto por Farrugia et al ⁽²⁾. As comparações entre as médias dos dias por metodologia foram realizadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. I, LES - *p*-value = 0,04 e *p*-value < 0,01 concentrações obtidas por NanoVue e Qubit, respectivamente; II, MEP - *p*-value = 0,86 e *p*-value < 0,01 concentrações obtidas por NanoVue e Qubit, respectivamente; III, FKL - *p*-value = 0,48 e *p*-value = 0,51 concentrações obtidas por NanoVue e Qubit, respectivamente.

Tabela 2 - Concentração do DNA extraído por metodologia empregada no presente estudo

	NanoVue			Qubit
	[] ng/µL I,III,V	260/280	260/230	[] ng/µL II,IV,V
A	203,4 ± 190,8 (5,2-759)	1,5 ± 0,5 (1,0-2,6)	0,5 ± 0,2 (0,1-0,9)	1,2 ± 1,1 (0,1-3,6)
B	317,8 ± 164,7 (13,7-711)	1,2 ± 0,2 (1,0-1,9)	0,7 ± 0,2 (0,3-0,9)	3,7 ± 4,7 (0,3-22,8)
C	59,5 ± 185,7 (7,5-932)	1,5 ± 0,2 (1,0-1,8)	0,6 ± 0,2 (0,4-1,0)	0,7 ± 0,3 (0,2-1,5)

Nota: Dados apresentados em média, desvio padrão e entre parênteses mínimo e máximo. A,- protocolo proposto por Simonato e Miyahara ⁽¹²⁾; B -protocolo proposto por Prience et al ⁽¹³⁾; C -protocolo proposto por Farrugia et al ⁽²⁾. As comparações entre as médias foram realizadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney; I, *p*-value <= 0,011 LES versus MEP; II, *p*-value = 0,002 LES versus MEP; III, *p*-value < 0,001 LES versus FKL; IV, *p*-value = 0,303 LES versus FKL; V, *p*-value < 0,001 MEP versus FKL

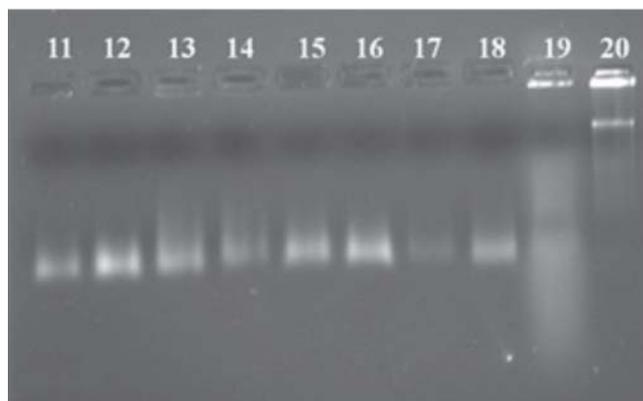


Figura 1 - Gel de integridade de DNA do material embocado em parafinado extraído pelos protocolos A, B e C.

Nota: Amostras 11, 13 e 15, extraídas nos dias 1, 2 e 3, respectivamente pelo protocolo A; amostras 12, 14 e 16, extraídas nos dias 1, 2 e 3, respectivamente pelo protocolo B; amostras 17, 18 e 19, extraídas nos dias 1, 2 e 3, respectivamente pelo protocolo proposto por C; amostra 20, DNA íntegro usado como controle.

Os resultados das ampliações expressos em CT (*Cycle Threshold*), isto é, o número do ciclo em que a absorbância das sondas ultrapassou o limiar de detecção. A variação entre o CT da sonda 1 e 2 possibilitou a determinação do genótipo das amostras, para o polimorfismo IL6 - 174G>C, expresso na Tabela 3. Somente com o protocolo C foi possível realizar a genotipagem em todas as triplicatas técnicas.

Tabela 3 - Resultado da PCR Real Time das amostras selecionadas aleatoriamente de acordo com a triplicata técnica de cada protocolo avaliado.

	Dia	Amostra	CT1	CT2	IL6 - 174G>C
A	1	I	-	-	-
	2	II	30,426	29,729	C/G
	3	III	31,584	34,295	C/C
B	1	IV	37,058	-	-
	2	V	28,229	27,435	G/G
	3	VI	31,663	32,189	C/G
C	1	VII	34,287	35,842	C/G
	2	VIII	30,091	33,966	C/C
	3	IX	29,543	32,513	C/C

Nota: CT1, curva de amplificação referente a sonda FAM; CT2, curva de amplificação referente a sonda VIC; A, protocolo o proposto por Simonato e Miyahara ⁽¹²⁾; B, protocolo proposto por Prience et al ⁽¹³⁾; C, protocolo proposto por Farrugia et al ⁽²⁾; CT1 e CT2, número do ciclo em que a absorbância da sonda 1 e 2 ultrapassou o limiar de detecção do aparelho, representando o alelo G e o alelo C, respectivamente; IL6 - 174 G>C, polimorfismo no gene da interleucina-6, posição 174, cuja troca é de uma guanina por citosina; C/G, paciente heterozigoto; C/C paciente homozigoto para citosina; G/G paciente homozigoto para guanina.

DISCUSSÃO

O número de trabalhos que utilizam tecido parafinado para realizar estudos de genotipagem cresce a cada dia e o desempenho das técnicas de obtenção de ácidos nucleicos

em quantidade, pureza e integridade é essencial para a prática de biologia molecular.⁽¹⁴⁾ Entretanto, um grande desafio para a extração do DNA de tecidos parafinados e fixados em formalina a 10% é a obtenção de um material de boa qualidade para a realização da PCR.

Um dos fatores que afetam a qualidade do material genético é o tipo de fixador e o tempo de fixação que o tecido é submetido, influenciando na preservação do DNA e, às vezes, tornando-o impróprio para a realização de análises através da PCR, por diminuir a quantidade e o tamanho do produto a ser amplificado, em comparação com tecidos frescos e congelados.⁽⁶⁾

Ao se analisarem os dados da concentração das amostras extraídas, relacionando-as com o dia da extração, observou-se que há reprodutibilidade dos protocolos com valores da quantificação obtido pelo NanoVue. No entanto, quando se comparou com a concentração obtida pelo Qubit, observou-se que há reprodutibilidade apenas no protocolo C.

É importante destacar que o NanoVue quantifica o material genético através da absorvância, o que permite detectar os ácidos nucleicos presentes, estando sua sequência gênica íntegra ou não; contudo, sua leitura pode sofrer interferências de outras moléculas, como proteínas e solventes orgânicos com grupos que conferem ressonância.⁽¹⁵⁾

O equipamento Qubit utiliza um fluorômetro específico para quantificar o DNA, possibilitando que se mensure com precisão a quantidade de cada biomolécula, mesmo na presença de outras moléculas. Este fluorômetro tem baixa fluorescência e, quando interligado entre as bases do DNA íntegro, passa a emitir uma intensa fluorescência, o que proporciona valores mais precisos do que aqueles obtidos por métodos de quantificação por absorvância de UV.⁽¹⁶⁾

Os resultados reportados por Simonato e Miyahara⁽¹²⁾ mostraram que o rendimento médio das amostras extraídas com o *QIAamp DNA mini kit*® e determinados por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) foi de 67,38 ng/μL, três vezes menor do que a média observada nas quantificações realizadas pelo NanoVue, no presente estudo. Esta diferença se deve à quantidade de material utilizado e às peculiaridades de cada tecido utilizado; nesta investigação foram coletados 20 μm do bloco de tecido tireoidiano parafinado, enquanto que Simonato e Miyahara⁽¹²⁾ coletaram 25 mg do assoalho bocal parafinado.

Na avaliação da relação 260/280, nenhuma das amostras permaneceu na faixa determinada como a ideal, mas comparando os resultados descritos por Simonato e Miyahara⁽¹²⁾ com as amostras extraídas pelo mesmo protocolo, no presente trabalho, observou-se uma semelhança dos valores obtidos.

Mesmo não avaliando a integridade deste material, Simonato e Miyahara⁽¹²⁾ mostraram que nem todas as amostras utilizadas amplificaram, inviabilizando a genotipagem de 14,3% das amostras. Apesar do presente estudo não ter

utilizado todas as amostras extraídas por esse método para a amplificação, os resultados obtidos após a PCR demonstraram ter uma tendência no comportamento das amostras durante esta técnica, já que 66% amplificaram.

O estudo feito por Prince et al⁽¹³⁾ mostrou que a concentração do DNA varia com o tipo de tecido e com a quantidade utilizada para a extração. Esses autores obtiveram a concentração do DNA por densidade óptica, recuperando aproximadamente 20 ng/μL, 12 ng/μL e 5 ng/μL, quando utilizado 1 mm do nódulo linfóide, da próstata e da laringe, respectivamente. Estas concentrações foram 15, 26 e 63 vezes inferiores às obtidas no presente estudo, demonstrando o impacto do tipo de tecido parafinado utilizado na concentração do material genético.

Prince et al⁽¹³⁾ relataram, ainda, a impossibilidade de realizar a amplificação de fragmentos maiores do que 240 pb, no entanto, fragmentos menores do que 146 pb foram amplificados sem maiores dificuldades. Importante mencionar que, havendo degradação na região a ser franqueada pelos iniciadores de escolha, a amplificação e genotipagem não ocorrerá.

O protocolo que apresentou o melhor rendimento na quantificação do DNA, nas condições descritas na metodologia deste trabalho, foi o utilizado por Prince et al.⁽¹³⁾ Este protocolo teve duração média de 20 horas, 13 horas a mais do que a técnica de extração relatada por Simonato e Miyahara;⁽¹²⁾ o tempo de digestão do tecido pela proteinase K foi a principal diferença segundo o fabricante do kit (Qiagen);⁽¹⁷⁾ para a realização do processo de digestão, o tempo pode variar com o tipo de tecido utilizado (3 a 16 horas).

Nos estudos realizados por Farrugia et al.,⁽²⁾ foi obtida a média da concentração de DNA com o protocolo empregado ($30,104 \pm 6,676$ μg para cada 100 mg de tecido). Esta média foi obtida através da quantificação das amostras de tecido cardíaco e hepático, submetidas ao protocolo, utilizando o *Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit* (Applied Biosystems, CA) com o *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System*.

Comparando-se a média obtida no protocolo de Farrugia et al.,⁽²⁾ pode-se observar que foi 43 vezes mais alta do que a obtida, no presente trabalho, com o Qubit ($0,7 \pm 0,3$ ng/μL), sugerindo que aquele protocolo exige uma grande quantidade de tecido para demonstrar um bom rendimento. Um ponto crítico na obtenção de concentrações adequadas de DNA, no protocolo descrito por Farrugia et al.,⁽²⁾ foram as diversas etapas de troca de solvente. É possível que tal procedimento tenha acarretado perda de tecido, o que resultou em baixa concentração de DNA. Outros pontos desfavoráveis dessa técnica estão relacionadas ao custo adicional para se obter a solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (v/v/v, 25:24:1) e ao tempo médio para a execução de todas as etapas (40 horas).

O método de genotipagem adotado por Farrugia et al.⁽²⁾ foi a PCR-RFLP e, apesar da degradação de DNA também

ter sido observada, foi possível determinar os genótipos, assim como na presente investigação.

Para se avaliar o grau de pureza, através da relação 260/230, o valor considerado ideal ficou entre 2,0 e 2,2. Valores menores do que estes são indicativos de que as amostras estão contaminadas com solventes orgânicos, como xilol, o que pode interferir na amplificação do material genético.⁽¹⁸⁾ Todos os métodos ficaram abaixo do valor satisfatório, indicando a permanência de xilol, mesmo depois de diversas etapas de lavagem.

CONCLUSÃO

O método C foi o que apresentou maior reprodutividade para genotipagem, apesar do maior custo e tempo de processamento, sendo este, a partir da comparação feita neste estudo, o método mais indicado para a implementação na rotina laboratorial de biologia molecular, para amostras preservadas em parafina.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer por disponibilizar o nosso acesso para a obtenção da amostra biológica. Aos médicos patologistas C.C.O. Ramos e M.Z. Fernandes pelo excelente auxílio na seleção das amostras. Ao CnPq, por disponibilizar a bolsa de Iniciação Científica através da modalidade PIBIC.

Abstract

Obtaining a integrate genetic material with satisfactory concentrations for amplification of a sequence determines are the main challenges for processing of tissue samples preserved in paraffin. This study aimed at comparing three extraction protocols of DNA which have in common the principle of extraction of silica gel. Twenty-seven samples of thyroid tissue preserved in paraffin were processed through cuts in triplicate of 20 µm. The method A used 3-hour to digest the tissue, the methods B and C used 16 hours to digestion. The last method utilized different solvents to rehydrate the tissue and solution of phenol-chloroform-alcohol isoamyl for purification. All methods used in common reagent set QIAamp DNA Mini Kit. In comparing the concentrations obtained DNA, method B has showed higher mean (3,7 ng/µL), while method A and C has obtained average value of 1,2 ng/µL and 0,7 ng/µL, respectively. All protocols have obtained values of the ratio 260/280 and 260/230 out for expected reference values, which indicating a loss in quality of the obtained DNA. The result of DNA integrity by agarose gel electrophoresis also demonstrated the highest degree of breakdown of all methods examined. However, it was possible to perform the genotyping of polymorphism of interleukin 6 gene (174G>C) in 100% of tested samples to method C and 66% for A and B. The method C is a method more reproductive for genotyping, although which had the higher cost and processing time. This is the best method for implementation in routine molecular biology laboratory for samples preserved in paraffin.

Keywords

Paraffin preservation; Molecular biology; DNA; PCR

REFERÊNCIAS

- Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47(5):541-8.
- Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic science international [Internet].* 2010 Jan 30 [acessado em 10 de abril de 2014];194(1-3):e25-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781880>
- Magdeldin S, Yamamoto T. Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Proteomics [Internet].* 2012 Apr [acessado em 15 de abril de 2014];12(7):1045-58. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huijsmans CJ, Damen J, Van der Linden JC, Savelkoul PH, Hermans MH. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. *BMC research notes [Internet].* 2010 Jan [acessado em 10 de abril de 2014];3:239. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2954845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cannavo I, Loubatier C, Chevallier A, Giordanengo V. Improvement of DNA extraction for human papillomavirus genotyping from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BioResearch open access [Internet].* 2012 Dec [acessado em 13 de abril de 2014];1(6):333-7. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3559202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *Journal of clinical microbiology [Internet].* 2010 Jun [Acessado em 11 de abril de 2014];48(6):2147-53. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dannaoui E, Schwarz P, Slany M, Loeffler J, Jorde AT, Cuenca-Estrella M, et al. Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study G. *Journal of clinical microbiology [Internet].* 2010 Jun [acessado em 13 de abril de 2014];48(6):2043-6. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Eijk R van, Stevens L, Morreau H, Wezel T van. Assessment of a fully automated high-throughput DNA extraction method from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue for KRAS, and BRAF somatic mutation analysis. *Experimental and molecular pathology [Internet].* Elsevier Inc.; 2013 Mar [acessado em 13 de abril de 2014];94(1):121-5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750048>
- Steinam M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics?: JMD [Internet].* Elsevier Inc.; 2011 Jul [acessado em 11 de abril de 2014];13(4):377-81. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv?: an international journal of pathology [Internet].* 2012 Feb [Acessado em 10 de abril de 2014];460(2):131-40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270699>

11. Niland EE, McGuire A, Cox MH, Sandusky GE. High quality DNA obtained with an automated DNA extraction method with 70+ year old formalin-fixed celloidin-embedded (FFCE) blocks from the indiana medical history museum. American journal of translational research [Internet]. 2012 Jan [acessado em 14 de abril de 2014];4(2):198-205. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3353536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Simonato LE, Miyahara GI. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. J Bras Patol Med Lab. 2007;43(2):121-7.
13. Prince ME, Ubell ML, Castro J, Ogawa H, Ogawa T, Narayan A, et al. Tissue-preserving approach to extracting DNA from paraffin-embedded specimens using tissue microarray technology. Head & neck [Internet]. 2007 May [acessado em 10 de abril de 2014];29(5):465-71. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17252596>
14. Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, Dybikowska A, Kowalska A, Falkiewicz B. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. International journal of molecular medicine [Internet]. 2001 Nov [acessado em 29 de março de 2014];8(5):573-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11605030>
15. GE Healthcare. NanoVue Plus™ - Product user Manual [Internet]. 2010 [acessado em 14 de abril de 2014]. Disponível em: http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Information_Sheets/NanoDrop/NanoVue.pdf
16. Life Technologies Corporation. Qubit® 2.0 Fluorometer [Internet]. 2011 [acessado em 14 de abril de 2014]. Disponível em: http://www.ebc.uu.se/digitalAssets/120/120354_qubitbrochure.pdf
17. Qiagen. QIAGEN Proteinase K. 2013 [acessado em 13 de abril de 2014]. Disponível em: <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Lab-Essentials-and-Accessories/QIAGEN-Proteinase-K#orderinginformation>
18. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. Journal of clinical pathology. 2005 Aug;58(8):894-5.

Correspondência

Vivian Nogueira Silbiger

Laboratório de Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológica
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Av. General Cordeiro de Faria s / n, Petrópolis
59012-570 - Natal, RN
e-mail: viviansilbiger@hotmail.com

Prevalência de resistência constitutiva e induzível à clindamicina em cocos Gram-positivos isolados de pacientes hospitalizados em Santa Maria, RS

Prevalence of clindamycin constitutive and inducible resistance in Gram-positive cocci isolated from hospitalized patients in Santa Maria, RS

Tiago de Castro Rodrigues¹

Leonardo Quintana Soares Lopes²

Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto³

Kendi Nishino Miyamoto⁴

Fábio Martins Pacheco⁵

José Alcides da Silva Viçosa¹

Marta Maria Medeiros Duarte Frescura⁶

Bruno Stefanello Vizzotto⁷

Roberto Christ Vianna Santos⁸

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de resistência constitutiva e induzível à clindamicina em pacientes hospitalizados. Foram analisados 63 isolados de diversos sítios infecciosos de pacientes internados em um hospital privado de Santa Maria - RS, Brasil. Para determinação dos mecanismos de resistência foi utilizado o método de difusão em disco (D-teste). Foi verificado que três cepas de *Staphylococcus aureus* (4,8%) apresentaram-se positivas no D-teste, ou seja, exibiram resistência induzível à clindamicina (MLS_Bi), possivelmente pela presença do gene *erm(A)*, em microrganismos dessa espécie. Ademais, foi observado a presença de resistência constitutiva (MLS_Bc), em 22 amostras, caracterizando, possivelmente, a presença do gene *erm(B)*, em *Streptococcus* sp. e *erm(C)*, em *Staphylococcus* sp. A prevalência do mecanismo de resistência mediado por bomba de efluxo, em 19 amostras, foi caracterizada, provavelmente, pela presença do gene *mrsA*. A introdução de mudanças, na rotina do laboratório, através da inclusão do D-teste deve ser encorajada. A pesquisa desses mecanismos de resistência são de elevada importância na escolha e eficácia terapêutica, pois representam, na prática, uma maior segurança para os pacientes e evitam a troca desnecessária de medicação e, conseqüentemente, a falha terapêutica.

Palavras-chave

Farmacoresistência bacteriana; Clindamicina; Eritromicina

INTRODUÇÃO

Os macrolídeos e as lincosamidas são antimicrobianos recomendados como opção terapêutica nas infecções causadas por cocos Gram-positivos,⁽¹⁾ especialmente em indivíduos alérgicos à penicilina.⁽²⁾ A resistência a estes fármacos representa uma crescente preocupação devido às suas altas taxas ao redor do mundo^(3,4) e dois mecanismos são comuns nesta resistência em *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Primeiro, o gene *Erythromycin Ribosome Methylation (erm)* codifica enzimas que metilam uma adenina na porção 23S do RNAr da subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a ligação de macrolídeos, lincosamidas e streptograminas do grupo B (caracterizando o

fenótipo de MLS_B). O fenótipo de MLS_B pode ser constitutivo (MLS_Bc – onde a enzima metilase é constantemente produzida), o que, normalmente, é decorrente da expressão do gene *erm (B)*, em *Streptococcus* sp., e *erm (C)*, em *Staphylococcus* sp.⁽⁵⁾ O fenótipo de MLS_B também pode ser induzível, através da eritromicina (ERI) (MLS_Bi), o que, geralmente, ocorre devido à presença do gene *erm (A)*, em ambos os gêneros.^(6,7) O gene *erm (A)* codifica um RNAm que só é traduzido na presença de um indutor como ERI. A clindamicina (CLI) não induz a tradução de *erm (A)*, porém, a indução de *erm (A)* traduzida, através da ERI, conduz a resistência à CLI.⁽⁵⁾

O segundo mecanismo pelo qual cepas de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. têm-se tornado resistentes

¹Farmacêutico - Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS.

²Biomédico, Mestre em Nanociências, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano – Santa Maria, RS.

³Farmacêutico, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Centro Universitário Franciscano

⁴Biomédico, Mestre em Biologia Molecular, Laboratório de Biologia Molecular, UFRGS - Porto Alegre, RS.

⁵Acadêmico do Curso de Medicina-UFSM, ex-bolsista do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Centro Universitário Franciscano

⁶Farmacêutica, Doutora em Bioquímica Toxicológica, Laboratório Labimed, Santa Maria, RS.

⁷Farmacêutico, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Biologia Molecular, Centro Universitário Franciscano – Santa Maria, RS.

⁸PhD (Professor Adjunto).

a macrolídeos, geralmente, ocorre por aquisição do gene *msrA*.^(2,8) O gene *msrA* codifica uma proteína de bomba de efluxo que bombeia entre 14 e 15 partes integrantes do anel de macrolídeos para fora do microrganismo, conduzindo à resistência a este fármaco. A expressão de *msrA* não conduz resistência à CLI, mesmo na presença de ERI.⁽⁵⁾ A prevalência desse tipo de resistência mostra grande variação geográfica, mas, geralmente, é menos comum que a resistência de MLSBi.^(7,9,10)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos não é capaz de identificar todos os fenótipos. Um teste de indução *in vitro* (D teste) pode distinguir cocos Gram-positivos que apresentem resistência induzível mediada pelo gene *erm* de outros que apresentem resistência mediada por genes *msrA*.

Isolados de *Staphylococcus aureus* com resistência constitutiva são resistentes à ERI e à CLI, *in vitro*, e isolados com resistência induzível são resistentes à ERI, mas parecem ser suscetíveis à CLI. *In vivo*, a terapia com CLI parece selecionar genes *erm* mutantes constitutivos,⁽⁵⁾ o que pode conduzir à falha terapêutica grave,^(11,12) por isso, deve-se reportar o resultado como sendo CLI-resistente (Tabela 1). Isolados com efluxo mediado por *msrA* também aparecem como ERI-resistente e CLI-suscetível, em testes *in vitro*, porém, tais isolados não se tornam tipicamente CLI-resistente, durante a terapia,⁽⁵⁾ podendo ser esse antimicrobiano, então, uma importante opção terapêutica (Tabela 1).

Os resultados de ensaios clínicos reforçam que a terapia com CLI seja evitada para isolados de *Staphylococcus* sp. que apresentem resistência do tipo MLSBi, mesmo quando apresentarem uma baixa concentração inibitória mínima (CIM), para a CLI (Tabela 1).^(5,11-13)

Para isolados ERI-resistente, testes de indução podem ajudar os laboratórios a determinar resultados para CLI que deveriam ser reportados como suscetível (quando o teste de indução é negativo) ou como resistente (quando o teste de indução é positivo). A falha para identificar a resistência induzível de MLSB pode conduzir ao fracasso clínico da terapia com CLI. Inversamente, a liberação de todo *Staphylococcus* ERI-resistente como CLI-resistente, impede o uso de CLI em infecções causadas por isolados de *Staphylococcus* e *Streptococcus* verdadeiramente CLI-suscetível,⁽¹⁾ portanto, é importante que os laboratórios

façam a distinção entre o fenótipo de MS e a resistência de MLSBi, antes de liberar um resultado como ERI-resistente para isolados de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. suscetíveis à CLI.⁽¹⁴⁾ Nesse contexto, este estudo tem como objetivo a determinação da prevalência de resistência constitutiva e induzível à clindamicina, em cocos Gram-positivos isolados de pacientes hospitalizados, em Santa Maria, RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Após o isolamento dos cocos Gram-positivos provenientes de amostras clínicas de pacientes internados em um Hospital privado de Santa Maria, RS, os mesmos foram identificados (através da utilização de métodos convencionais ou automatizados) e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Centro Universitário Franciscano, em meios de cultura de transporte Stuart ou Amies. No laboratório, os swabs foram retirados do meio de transporte e inoculados em agar base sangue com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e, em seguida, as placas foram incubadas a 36,5-37°C, por 24 horas.

Decorrido o tempo necessário de incubação, foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica estéril até se obter turvação de 0,5 na escala Mac Farland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, com o auxílio de swab estéril embebido na suspensão, foi semeada na superfície de placas contendo agar Mueller-Hinton. Posteriormente, foram adicionados discos de papel impregnados com os antimicrobianos eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg) com auxílio de uma pinça estéril. Os discos foram dispostos a uma distância de 26 mm de centro a centro, segundo preconizado por Oplustil e colaboradores.⁽¹⁵⁾ Foi considerado teste de indução positivo aquele em que se observou um achatamento do halo da clindamicina adjacente ao halo da eritromicina, produzindo uma zona de inibição amoldada em forma de "D", e foi considerado negativo aquele que não apresentou achatamento do halo. Com auxílio de uma régua, mediu-se o diâmetro dos halos. Realizou-se o controle de qualidade com as cepas *S. aureus* ATCC 25923 (ERI e CLI suscetível, controle negativo para *erm A*, *erm C* e *mrsA*) e *S. aureus* 58-424 (que contém o gene *ermA* e demonstra resistência induzível à MLSB).

Tabela 1- Fenótipos de Resistência observados após teste de indução "in vitro".

Mecanismo	Gene	Enzima	ERI	CLI	Teste de indução	Como Reportar	Fenótipo
Alteração	<i>Erm</i>	MLSBi	R	S	+	ERI-R, CLI-R	MSLBi
Ribossômica	<i>Erm</i>	MLSBc	R	R	-	ERI-R, CLI-R	MSLBc
Efluxo	<i>mrsA</i>		R	S	-	ERI-R, CLI-S	MS

erm = erithromycin ribosome methylase; *msrA* = macrolide streptogramin (type B) resistance; ERI = eritromicina; CLI = clindamicina; R = resistente; S = sensível; + = teste de indução positivo; - = teste de indução negativo

(Adaptado de Oplustil e colaboradores, 2004)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas 63 amostras de cocos Gram-positivos provenientes de isolados clínicos de pacientes internados em um hospital privado de Santa Maria, RS. Estas amostras foram coletadas de diversos sítios infecciosos, como escarro, hemoculturas, lavados brônquicos, pontas de catéteres, secreções de ferimentos de diversos locais do corpo, secreções nasais, secreções traqueais e urina, como mostra a Tabela 2.

Dentre as amostras, foram identificadas 46 de *Staphylococcus aureus*, 8 de *Staphylococcus* Coagulase Negativa (CoNS), 4 de *Streptococcus pyogenes* e 5 de *Streptococcus* não hemolíticos, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 2 - Espécimes clínicos de pacientes hospitalizados em Santa Maria-RS

Sítio Infeccioso	n	%
Secreções de ferimentos	16	25,4%
Urina	15	23,8%
Sangue	7	11,1%
Secreção nasal	6	9,5%
Lavado brônquico	5	7,94%
Escarro	5	7,94%
Secreção traqueal	5	7,94%
Ponta de catéter	4	6,35%

Tabela 3 - Cocos Gram-positivos isolados de pacientes hospitalizados em Santa Maria-RS

Microrganismo	n	%
<i>S. aureus</i>	46	73%
CoNS	8	12,7%
<i>Streptococcus</i> não hemolíticos	5	7,9%
<i>S. pyogenes</i>	4	6,4%

Das 63 amostras analisadas, apenas três (4,8%) apresentaram zona de achatamento do halo de inibição do antimicrobiano (CLI), resultando na positividade para o teste de indução (D-teste), isto é, apresentaram resistência induzível à CLI (MLS_{Bi}), caracterizada pela presença do gene *erm* (A), conforme pode ser visualizado na Tabela 4. Com isso, ficou impossibilitada a utilização da CLI no tratamento desses pacientes, pois, *in vivo*, este antimicrobiano parece selecionar genes *erm* mutantes constitutivos,⁽⁶⁾ o que poderá

conduzir a uma grave falha no tratamento dessas infecções. O achatamento da zona de inibição da CLI (disco-difusão) em um isolado ERI-R (efeito de D-zona) é um indicador seguro de cepas MLS_{Bi} que abrigam os genes *ermA* ou *ermC*. Cepas de MLS_B-resistentes são facilmente reconhecidas por um diâmetro da zona de inibição da CLI ≤14 mm. Cepas ERI-S não apresentam resistência induzível à CLI.⁽¹⁴⁾

Isto conduz ao questionamento sobre a segurança do uso de CLI contra qualquer *Staphylococcus* ERI-R. Devido à alta incidência de resistência induzível à MLS_B, verificada em vários países do mundo, particularmente em *S. aureus*,⁽¹⁶⁾ sugere-se que em resistência *in vitro* a ERI possa servir como um substituto para todos os agentes de MLS, embora os resultados do teste de suscetibilidade e o teste de indução de disco sejam executados em infecções graves provenientes de isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (CoNS).⁽¹⁷⁾

No presente estudo, foi observada a presença de resistência constitutiva (MLS_{Bc}) em 22 amostras (35%), sendo 16 de *S. aureus* (72,7%), duas de *Streptococcus pyogenes* (9,1%), uma de *Streptococcus* não hemolítico (4,55%) e três de CoNS (13,65%), caracterizando, possivelmente, a presença do gene *erm* (B), em *Streptococcus* sp., e *erm* (C), em *Staphylococcus* sp, como mostra a Tabela 4. Em um estudo realizado, em 2003, Fiebelkorn e colaboradores⁽¹⁴⁾ descreveram dados referentes à CoNS, onde, geralmente, têm-se resistência do tipo MLS_{Bi} (ERI-R); todavia, isolados de CoNS (CLI-S) são menos comuns do que em *S. aureus*. As taxas deste tipo de resistência variaram entre 28% a 84%.

Neste estudo, também foi determinada a prevalência de mecanismos de resistência mediado por bombas de efluxo, em 19 amostras (30,2%), sendo 15 de *S. aureus* (79%), uma de *Streptococcus pyogenes* (5,3%) e três de CoNS (15,7%), o que caracterizou uma possível presença do gene *mrsA* (Tabela 4). Mecanismos que conferem resistência a macrolídeos e não às lincosamidas, como mecanismos de efluxo codificados por *mrsA*, não são incomuns e podem estar frequentemente elevados.⁽⁷⁾

Dados de suscetibilidade precisos são importantes para decisões apropriadas de terapia. Desta forma, deve-se determinar a resistência induzível à CLI para assim utilizar a CLI seguramente e efetivamente em pacientes com cepas verdadeiramente CLI-S. Neste estudo, foi utilizado um método simples e seguro para determinar a resistência induzível a

Tabela 4 - Principais mecanismos de resistência em cocos Gram-positivos isolados de pacientes hospitalizados em Santa Maria-RS

Microrganismo	Alteração Ribossômica (MLS _{Bi})	Alteração Ribossômica (MLS _{Bc})	Teste de Indução (D teste) Positivo	Bomba de Efluxo
<i>S. aureus</i>	3 (4,8%)	16 (25,4%)	3 (4,8%)	15 (23,8%)
CoNS	-	3 (4,8%)	-	3 (4,8%)
<i>S. pyogenes</i>	-	2 (3,2%)	-	1 (1,6%)
<i>Streptococcus</i> não hemolíticos	-	1 (1,6%)	-	-

CLI, em isolados de *S. aureus*, CoNS e *Streptococcus* sp. Foi realizado um exame cuidadoso da forma da zona de inibição da CLI (15 g), adjacente a um disco padrão de ERI (2 g) em um teste de disco-difusão convencional.

CONCLUSÃO

No presente estudo foram observados 4,8% de resistência induzível à clindamicina (MLS_{Bi} - ERI-R; CLI-S), em amostras de cocos Gram-positivos provenientes de isolados de pacientes hospitalizados, no município de Santa Maria-RS. Espera-se que os resultados obtidos fundamentem as decisões no âmbito da clínica, pela introdução de mudanças na rotina de exames, que deve incluir o D-teste para uma maior segurança dos pacientes em tratamento, evitando assim a resistência microbiana, a troca desnecessária de medicação e, conseqüentemente, a falha terapêutica. A implementação do uso do D-teste, na rotina laboratorial, permite fazer a distinção entre os fenótipos de maneira simples e eficaz.

Abstract

The aim of this study was to determine the prevalence of constitutive and inducible clindamycin resistance in inpatients. Six three isolates were analyzed from various infectious sites of inpatients admitted in a private hospital in Santa Maria - RS, Brazil. In order to determine the mechanisms of resistance, it has been applied the method of disk diffusion (D-test). It was observed that 3 strains of *Staphylococcus aureus* (4.8%) had a positive test, having inducible clindamycin resistance (MLS_{Bi}) possibly by the presence of the *erm(A)* gene. Furthermore, it was observed the presence of constitutive resistance (MLS_{Bc}) in 22 samples possibly characterized by the presence of *erm(B)* gene in *Streptococcus* sp. and *erm(C)* gene in *Staphylococcus* sp. It was determined by the prevalence of resistance mechanisms mediated efflux pump in 19 samples, probably characterized by the presence of *mrsA* gene. The introduction of changes in the laboratory routine, by including the D-test should be encouraged. The study of these mechanisms of resistance is of great importance in the selection and treatment efficacy, in practice they represent a greater safety for patients and avoid unnecessary exchange of drugs and therefore the treatment failure.

Keywords

Drug Resistance, Bacterial; Clindamycin; Erythromycin

REFERÊNCIAS

1. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH; Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2002;35(2):113-25.
2. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(8):1817-24.
3. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh. N Engl J Med. 2002;346(16):1200-6.
4. Biedenbach DJ, Stephen JM, Jones RN. Antimicrobial susceptibility profile among beta-haemolytic Streptococcus spp. collected in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program--North America, 2001. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;46(4):291-4.
5. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002;34(4):482-92.
6. Seppälä H1, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(2):257-62.
7. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(12):2823-30.
8. Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol. 1996;22(5):867-79.
9. De Azavedo JC, Yeung RH, Bast DJ, Duncan CL, Borgia SB, Low DE. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(9):2144-7.
10. Weiss K, De Azavedo J, Restieri C, Galarneau LA, Gourdeau M, Harvey P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A streptococcus strains in the province of Quebec, Canada. J Antimicrob Chemother. 2001;47(3):345-8.
11. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. J Antimicrob Chemother. 2001;48(2):315-6.
12. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. Clin Infect Dis. 2003;37(9):1257-60.
13. Rayner C, Munckhof WJ. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. Intern Med J. 2005;35 Suppl 2:S3-16.
14. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4740-4.
15. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto IS. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2a ed. São Paulo: Sarvier Editora; 2004.
16. Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Tjho JT, Kelkar S, Schreckenberger PC, et al. Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Pediatr Infect Dis J. 2002;21(6):530-4.
17. Sanchez ML, Flint KK, Jones RN. Occurrence of macrolide-lincosamide-streptogramin resistances among staphylococcal clinical isolates at a university medical center. Is false susceptibility to new macrolides and clindamycin a contemporary clinical and in vitro testing problem? Diagn Microbiol Infect Dis. 1993;16(3):205-13.

Correspondência

Tiago de Castro Rodrigues

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Nanociências
Centro Universitário Franciscano
Rua dos Andradas 1614, sala 413-A
97010-032 – Santa Maria, RS, Brasil
Telefone/Fax: + 55 (55) 3220-1200
PRGPE/UNIFRA

Avaliação do rastreamento para o Diabetes Gestacional no município de Passo Fundo, RS

Assessment of tracking for Gestational Diabetes in Passo Fundo town, RS

Marina Koppe¹
Claudia Cavalet²

Resumo

O diabetes gestacional é definido como uma intolerância variável aos carboidratos, sendo detectada durante a gestação. Foram analisadas gestantes cadastradas no Planejamento Familiar da Saúde da Mulher, no Posto de Atendimento Médico, nos anos de 2007 e 2008, no município de Passo Fundo, RS, com o objetivo de quantificar a prevalência do *diabetes mellitus* e avaliar os métodos de rastreamento realizados nestas gestantes. Foram avaliadas 618 gestantes com idade igual ou superior a 25 anos. A prevalência do diabetes gestacional, nesta população, foi de 5,6%. Todas as gestantes realizaram a glicose de jejum na 1ª consulta do pré-natal. Das gestantes que apresentaram rastreamento positivo, 16 confirmaram a doença através do Teste Oral de Tolerância a Glicose e 6, por meio da repetição da glicemia. Após a 20ª semana de gestação, somente 295 retornaram para realizar a glicemia e 12 gestantes confirmaram diabetes gestacional. Pelos dados obtidos, as Unidades Básicas de Saúde encaminham as gestantes corretamente para a realização do rastreamento. Porém, o problema que as unidades enfrentam é o preenchimento incorreto dos cartões, com falta de dados e a falta de orientação para o encaminhamento, na realização do Teste Oral de Tolerância a Glicose.

Palavras-chave

Gravidez; *Diabetes mellitus* gestacional; Rastreamento; Prevalência

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença de etiologia múltipla, consistindo em um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, na qual a hiperglicemia é o fator em comum.⁽¹⁾ Essa patologia é considerada uma doença sistêmica que se evidencia por alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e eletrólitos, de caráter crônico e evolutivo decorrentes da falta de insulina e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, resultando em resistência insulínica, com grande diversidade de complicações no metabolismo humano.⁽²⁾

A insulina é um hormônio secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, após as refeições. É considerado essencial para manter a homeostase da glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose e aumentando a captação periférica da mesma, principalmente, no tecido muscular e adiposo, sendo também responsável por aumentar a síntese e inibir a degradação proteica.⁽³⁾

O DM tornou-se uma epidemia mundial e um problema de saúde pública. Em 1985, estimava-se a existência de

aproximadamente 30 milhões de adultos diabéticos; em 1995, esse número cresceu para 135 milhões, atingindo 173 milhões em 2002, com uma projeção de poder chegar até 300 milhões de diabéticos em 2030.⁽⁴⁾ Segundo a *International of Diabetes Federation* (IDF) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), só no Brasil calcula-se que, dos 160 milhões de habitantes, 10% da população, ou seja, 16 milhões, apresentem a doença.⁽⁵⁾

Um dos fatores que têm contribuído para este aumento é a alteração no estilo de vida das pessoas, com modificações do comportamento alimentar.⁽⁶⁾

Desde 1997, a Associação Americana de Diabetes (ADA) definiu a atual classificação para DM e passou a basear-se na etiologia da doença e não na sua forma de tratamento.⁽⁷⁾ De acordo com a classificação atual proposta pela OMS e pela ADA, o DM se divide em *diabetes mellitus* tipo 1, *diabetes mellitus* tipo 2, outros tipos específicos de diabetes e o *diabetes mellitus* gestacional, além dos pré-diabéticos, que caracterizam-se pela glicemia de jejum alterada ou tolerância diminuída à glicose (Quadro 1).⁽¹⁾

O *diabetes mellitus* gestacional é definido como uma intolerância variável aos carboidratos, que resulta em hiper-

Trabalho desenvolvido através dos dados da Secretária da Saúde do município de Passo Fundo, RS.

¹Graduanda curso de Biomedicina da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.

²Farmacêutica Bioquímica, Profª MsC da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.

Artigo recebido em 26/04/2010

Artigo aprovado em 20/11/2014

Quadro 1- Classificação etiológica do diabetes mellitus.

I - Diabetes tipo 1
Destrução das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
A - Imune
B - Idiopática
II. Diabetes tipo 2
Graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina
III. Outros tipos específicos
Defeitos genéticos da função da célula b
Defeitos genéticos da ação da insulina
Doenças do pâncreas exócrino
Endocrinopatias
Indução por drogas ou produtos químicos
Infecções
Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
IV. Diabetes mellitus gestacional

glicemia, sendo detectada durante a gestação. Esta patologia é explicada pela elevação de hormônios contrarreguladores da insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais).⁽⁹⁾ Rudge e Calderon⁽¹⁰⁾ relatam que o DM tornou-se uma das doenças mais importantes e com maior prevalência deste século, em todo o mundo. Desse modo, a associação entre diabetes e gravidez será cada vez mais frequente. Quando a gestante desenvolve DM durante a gravidez, o risco de desenvolver o diabetes do tipo 2, após a gestação, é maior do que em gestantes que não apresentaram a doença.

Até o início da insulino-terapia, em 1921, a relação diabetes e gravidez demonstrava resultados catastróficos, na mortalidade materna. Após o surgimento da insulina, tornou-se possível estudar a gravidez em mulheres diabéticas, pois, além desse evento ser incomum na época, a mortalidade materna era elevada. A taxa de mortalidade foi reduzida de 65% para 5% após serem instituídos os cuidados do pré-natal.⁽¹¹⁾

Além do estado fisiológico imposto pelo período gestacional, outros fatores considerados de risco são gestantes acima de 25 anos, obesidade ou ganho excessivo de peso na gestação, baixa estatura, histórico familiar de DM em parentes de 1º grau, macrosomia, polidramnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez, entre outros.⁽¹²⁾

No primeiro trimestre de gestação, a mulher pode apresentar períodos de hipoglicemia, devido ao aumento dos hormônios estrogênio e progesterona, provocando uma hiperplasia das células betapancreáticas, e, com isso, aumentando a produção de insulina, o que diminui a glicose circulante.⁽¹¹⁾ No segundo trimestre da gravidez, a resistência à insulina aumenta progressivamente. Hormônios, como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário, que estão envolvidos na gestação, podem interferir na ação da insulina no organismo materno, funcionando como antagonista de sua ação, causando, por isso, aumento na resistência.⁽¹³⁾ Segundo Schmitt et al.,⁽¹⁴⁾ o

pâncreas começa a produzir uma quantidade adicional de insulina para compensar o efeito de resistência imposto pelo período gestacional. Quando o pâncreas já atingiu o máximo da produção insulínica e a quantidade continua sendo insuficiente para reverter os efeitos hormonais, esse mecanismo resultará em hiperglicemia.

A importância de realizar corretamente o pré-natal e o rastreamento para o DM gestacional pode evitar complicações neonatais, como aumento de partos cesarianos, policitemia, icterícia, hipoglicemia e aumento do risco de malformação congênitas.⁽¹⁵⁾ A macrosomia é considerada a principal preocupação, devido aos níveis elevados de glicose que o feto recebe da mãe, e à hipoglicemia pós-natal, na qual a produção de insulina produzida pelo feto encontra-se aumentada para poder compensar a quantidade de glicose que lhe é imposta.⁽¹³⁾

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) destaca que a monitoração da glicose é considerada importante no controle do tratamento para as gestantes diabéticas. O tratamento reduz a taxa de macrosomia, a hipoglicemia do bebê e a taxa de cesarianas realizadas, entre outros problemas já mencionados. O tratamento consiste, inicialmente, de alimentação controlada.⁽¹⁶⁾

O rastreamento e o diagnóstico são considerados controversos em decorrência do número muito limitado de estudos nessa área.⁽¹⁷⁾ Gross et al.⁽¹⁸⁾ demonstraram que a investigação do diabetes é realizada, a partir da primeira consulta do pré-natal, com a determinação da glicose em jejum. Conforme Metzger, Coustan e a *The Organizing Committee*,⁽¹⁹⁾ a probabilidade de aparecimento do DM gestacional é maior no terceiro trimestre de gestação. Dessa forma, o rastreamento deve ser efetuado em todas as gestantes, entre as 24ª e 28ª semanas de gestação, já que, nesse período, a resistência à insulina é maior.

O rastreamento do DM gestacional realizado no pré-natal é um importante fator a ser considerado na gravidez, o que pode permitir a prevenção das complicações materno-fetal relacionadas ao diabetes. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o de realizar uma análise de dados das gestantes com idade igual ou superior a 25 anos, cadastradas no Planejamento Familiar da Saúde da Mulher, no Posto de Atendimento Médico (PAM), no município de Passo Fundo, RS, quantificando o número de casos de DM gestacional, no ano 2007 e 2008, e avaliando o acompanhamento da gestante desde a primeira consulta até o término do rastreamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizada uma visita ao Planejamento Familiar da Saúde da Mulher, para conhecer o Programa de Humanização no Pré-Natal e Nascimento. Em seguida, para a devida análise dos prontuários, foi necessária a liberação da Secretaria de Saúde do Município, para que fosse permitido o acesso aos dados para a pesquisa. O estudo

epidemiológico do tipo transversal, descritivo, quantitativo foi realizado por meio da análise de 1.667 cartões de gestante armazenados em arquivos pertencentes ao Planejamento Familiar, Saúde da Mulher, dos anos de 2007 e 2008. Do total de gestantes, 618 foram selecionadas para o estudo. Os critérios utilizados como exclusão foram gestantes com idade abaixo de 25 anos, gestantes que não apresentaram dados completos como idade, valores das glicemias e gestantes de outros municípios.

Os cartões das gestantes foram analisados manualmente, e os dados obtidos foram tabulados no programa Excel, em porcentagem, média e desvio padrão, e expressos em tabelas.

Para determinar a prevalência do DM gestacional na população em estudo e avaliar os métodos de rastreamento realizados nas gestantes que foram cadastradas junto ao Planejamento Familiar da Saúde da Mulher quantificou-se o número de gestantes que realizaram a glicemia de jejum na 1ª consulta e, a partir dessas, avaliou-se quantas tiveram rastreamento negativo ou positivo para o DM gestacional.

Também foi quantificado o número de gestantes que retornaram para avaliação da glicemia, após a 20ª semana de gestação, e quantas foram encaminhadas a realizar o Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).

O protocolo de rastreamento adotado pelo Planejamento Familiar da Saúde da Mulher é o mesmo preconizado pela SBD,⁽²⁰⁾ no qual se realiza uma glicemia de jejum, na primeira consulta, sendo que uma glicemia ≥ 85 mg/dL e <110 mg/dL é considerada rastreamento positivo para o DM gestacional. Neste caso, é solicitado o TOTG, utilizando a ingestão de 75 g de glicose anidra e realizando a glicemia 2 horas após a ingestão. Quando a glicemia for ≥ 110 mg/dL, deve ser imediatamente confirmada. Se esse valor, na segunda coleta, for ainda ≥ 110 mg/dL, confirma-se o diagnóstico de DM gestacional (Figuras 1 e 2).

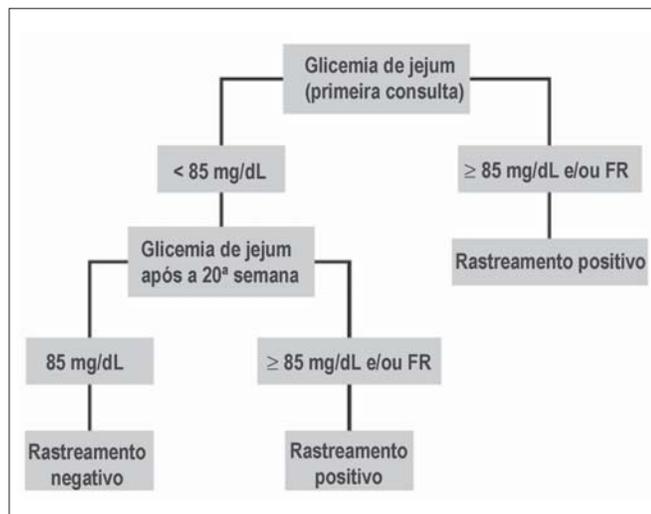


Figura 1. Procedimento para o rastreamento de diabetes mellitus gestacional.

Fonte: Diretrizes SBD⁽²⁰⁾

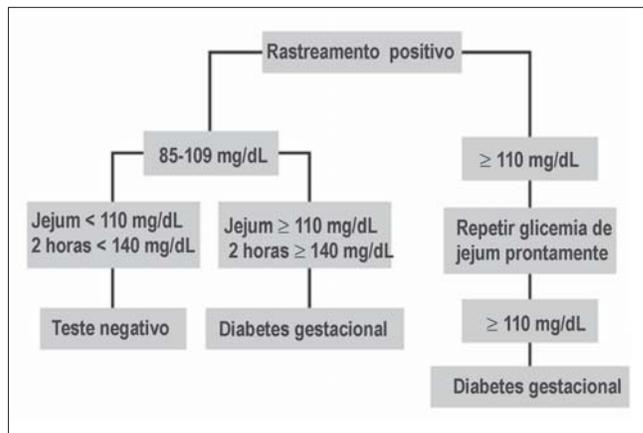


Figura 2. Procedimento para o diagnóstico de diabetes gestacional. Fonte: Diretrizes SBD⁽²⁰⁾

RESULTADOS

Neste estudo, foram avaliadas 618 gestantes com idade igual ou superior a 25 anos, sendo que a idade no grupo variou de 25 a 48 anos. A prevalência do DM gestacional, nessa população, no período de 2007 e 2008, foi de 5,6%. Em relação à faixa etária, pôde-se observar que a faixa mais acometida pelo DM gestacional foi entre 31 e 36 anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional cadastradas pelo PAM em 2007 e 2008 no município de Passo-Fundo, RS, separadas por faixa etária

Idade (anos)	Total de gestantes por faixa etária (n)	Gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional por faixa etária (n)
25 - 30	328	10
31 - 36	188	13
37 - 42	96	11
43 - 48	6	1
Total	618	35

Todas as gestantes analisadas, no presente estudo, realizaram a glicose de jejum na 1ª consulta do pré-natal. Destas, 164 (26,53%) apresentaram glicemia ≥ 85 mg/dL (rastreamento positivo). As outras 454 (73,46%) tiveram o rastreamento negativo (glicemia < 85 mg/dL). Na Tabela 2, está demonstrado o número de gestantes que apresentaram glicose de jejum < 85 mg/dL e ≥ 85 mg/dL, por faixa etária, na 1ª consulta.

Tabela 2 - Número de gestantes cadastradas pelo PAM em 2007 e 2008 que apresentaram rastreamento negativo e positivo para o Diabetes Mellitus Gestacional na 1ª consulta do pré-natal separadas por faixa etária

Idade (anos)	Gestantes com glicemia < 85 mg/dL na 1ª consulta (n)	Gestantes com glicemia ≥ 85 mg/dL na 1ª consulta (n)
25 - 30	236	92
31 - 36	145	44
37 - 42	70	26
43 - 48	3	2
Total	454	164

Do total de 164 (26,53%) gestantes que apresentaram hiperglicemia na 1ª consulta, apenas 67 (40,85%) realizaram o TOTG de 75g, recomendado para as gestantes que tiveram glicemia ≥ 85 mg/dL nessa fase. Das mulheres grávidas que realizaram o TOTG, 16 (23,88%) apresentaram glicemia 140 mg/dL, no TOTG, confirmando o DM gestacional. No entanto, das 97 (59,14%) gestantes que não realizaram o exame, seis (6,18%) confirmaram o diagnóstico DM gestacional, apenas realizando a glicemia de jejum, ou seja, apresentaram glicemia ≥ 110 mg/dL (Tabela 3).

Das 454 (73,46%) gestantes que, na 1ª consulta, apresentaram glicemia < 85 mg/dL e deveriam retornar para realizar o exame, após a 20ª semana, apenas 295 (64,97%) realizaram o exame novamente. Destas, 53 (17,96%) apresentaram glicose de jejum ≥ 85 mg/dL e 12 (22,64%) mulheres confirmaram o DM gestacional, nesse período. Das grávidas que confirmaram o DM gestacional, após a 20ª semana, 10 (83,33%) o confirmaram, com a realização do TOTG, e duas (16,66%) confirmaram o diagnóstico, repetindo a glicemia (≥ 110 mg/dL) (Tabela 4).

Tabela 3 - Número de gestantes cadastradas pelo PAM em 2007 e 2008 que apresentaram glicose de jejum ≥ 85 mg/dL na 1ª consulta, realizaram o TOTG e confirmaram o Diabetes Mellitus Gestacional, separadas por faixa etária

Idade (anos)	Glicose 1ª Consulta ≥ 85 mg/dL (n)	Realizaram TOTG* (n)	TOTG* ≥ 140 mg/dL (n)	DMG* confirmada com glicemia ≥ 110 mg/dL (n)
25 - 30	92	33	6	3
31 - 36	44	18	4	2
37 - 42	26	14	5	1
43 - 48	2	2	1	0
Total	164	67	16	6

TOTG: Teste Oral de Tolerância a Glicose; DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

Tabela 4 - Número de gestantes cadastradas pelo PAM em 2007 e 2008 que tiveram glicemia ≥ 85 mg/dL na 1ª consulta e que confirmaram o DM gestacional após a 20ª semana, separadas por faixa etária.

Idade (anos)	Glicose 1ª Consulta < 85 mg/dL (n)	Glicemia de jejum ≥ 85 mg/dL após a 20ª semana (n)	Realizaram TOTG* (n)	TOTG* ≥ 140 mg/dL (n)	DMG* confirmada com glicemia ≥ 110 mg/dL (n)
25 - 30	236	16	8	0	0
31 - 36	145	22	11	6	1
37 - 42	70	15	12	4	1
43 - 48	3	0	0	0	0
Total	454	53	31	10	2

TOTG: Teste Oral de Tolerância a Glicose; DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

DISCUSSÃO

Os programas utilizados pelo PAM de Passo Fundo-RS prestam atendimento às gestantes através de um convênio firmado com o Sistema Único de Saúde (SUS) do Programa de Humanização no Pré-Natal e Nascimento, que assegura o acesso e a qualidade do acompanhamento pré-natal, assistência ao parto e puerpério e a assistência neonatal, tendo como objetivo captar precocemente gestantes consideradas de alto risco e garantir o atendimento e assistência às mesmas, com a finalidade de reduzir as altas taxas de morbi-mortalidade materna e perinatal. Este programa foi instituído pelo Ministério da Saúde, através da Portaria/GM nº 569, de 01/06/2000.^(21,22)

Os casos de mulheres que apresentam DM gestacional podem variar de acordo com a população avaliada e com os métodos utilizados para rastreamento e diagnóstico. Neste estudo, a prevalência de DM gestacional na população atendida pelo PAM de Passo Fundo-RS, em 2007 e 2008, foi

de 5,6%. O mesmo ocorreu no estudo de Schmitt,⁽¹³⁾ onde a prevalência de DM gestacional, em São Joaquim e Santa Catarina, foi de 5,60%. A prevalência, na análise de Valladares e Komka,⁽¹⁶⁾ realizada em Brasília, foi de 6,6%. Conforme a Organização Mundial da Saúde, a prevalência de mulheres que são atendidas pelo SUS, no Brasil, e que apresentam DM gestacional, encontra-se em torno de 7,6% do total das gestantes, sendo um dos distúrbios mais acometidos na gravidez.⁽¹⁶⁾

Segundo dados do Ministério da Saúde, 9,5% dos casos de DM gestacional do País foram registrados na cidade de Manaus. Em Fortaleza, este índice é de 8,5% e, em Porto Alegre, a prevalência é de 4,7%.⁽²³⁾ Registros da *American Diabetes Association (ADA)*⁽²³⁾ apontam que cerca de 4% de todas as mulheres grávidas apresentam DM gestacional. Nos Estados Unidos, a cada ano, cerca de 135 mil casos de gestantes diabéticas são constatados.

Os dados obtidos das gestantes analisadas mostraram que 618 realizaram a glicemia de jejum, na 1ª consulta

do pré-natal, sendo 73,46% consideradas rastreamento-negativo, e 26,53%, rastreamento-positivo, para o DM gestacional. Destas gestantes que apresentaram-se como rastreamento-positivo, apenas 40,85% realizaram o TOTG de 75 g, para confirmação do DM gestacional, sendo que o preconizado pela SBD⁽²⁰⁾ é que todas as gestantes com glicemia alterada, na 1ª consulta, realizem o TOTG. Desta forma, neste período, pôde-se confirmar o diagnóstico da doença, em 26,88% das gestantes, com a realização do TOTG. Um estudo realizado por Katz et al.⁽²⁴⁾ informou a análise de 210 gestantes que realizaram o TOTG, caracterizando, desse modo, uma população selecionada e de alto risco, o que não ocorreu no presente estudo, já que, 59,14% das gestantes não realizaram o TOTG na 1ª consulta.

Das gestantes que na 1ª consulta do pré-natal apresentaram uma glicemia < 85 mg/dL (73,46%), somente 64,97% realizaram o pré-natal corretamente e retornaram, após a 20ª semana, para repetir a glicemia de jejum, sendo que 17,96% apresentaram glicose de jejum ≥ 85 mg/dL e 22,64% das mulheres confirmaram o DM gestacional. Para que se tenha um controle do estado glicêmico da gestante é recomendado, pelo Ministério da Saúde, a realização da glicemia de jejum. Esse exame deverá ser solicitado a todas as gestantes, independente da presença ou não de fator de risco para a gravidez.⁽²⁵⁾

Conforme Katz et al.,⁽²⁴⁾ as gestantes que apresentam algum fator de risco para o desenvolvimento do DM gestacional ou alteração da glicemia são consideradas de alto risco e devem ser encaminhadas para realizar o TOTG. De acordo com Ayach,⁽¹⁴⁾ o ideal, para validação do teste, é que todas as gestantes realizem o TOTG, o que nem sempre é possível. Esse fato foi reafirmado com um caso apresentado, neste estudo, onde uma gestante que na 1ª consulta apresentou um glicemia < 85 mg/dL e que, retornando para realizar um novo exame, após a 20ª semana, obteve, novamente, um rastreamento negativo e, mesmo assim, foi encaminhada para a realização do TOTG. No TOTG, apresentou uma glicose de 170 mg/dL, confirmando o diagnóstico para DM gestacional. Essa situação demonstra a importância da realização do teste, mesmo em casos em que a glicemia apresenta-se normal.⁽¹⁴⁾

Pelos dados obtidos, as Unidades Básicas de Saúde encaminham as gestantes corretamente para realização do rastreamento exigido pela OMS e pela SBD. Porém, os problemas que as unidades enfrentam é o preenchimento incorreto do cartão das gestantes, o que dificulta o encaminhamento para a realização do TOTG, que é considerado o exame mais sensível para identificar indivíduos com diabetes. No entanto, a ADA reporta que o TOTG é muitas vezes realizado de forma incorreta, sem preparação prévia, podendo levar a náuseas e vômitos, nas gestantes.⁽¹⁸⁾ Segundo o relatado no Planejamento Familiar da Saúde da Mulher,⁽²⁶⁾ muitas gestantes, efetivamente, encontraram dificuldades em realizar o exame, devido aos enjoos no

procedimento de execução do teste, o que pode ter contribuído para o baixo número de gestantes que realizaram o TOTG, neste estudo.

CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados, na presente avaliação, pode-se concluir sobre a importância da realização do rastreamento no pré-natal, visto que a prevalência do DM gestacional, no Município de Passo Fundo-RS, mostrou-se semelhante a outros estudos realizados em grandes centros do País, demonstrando que a doença é, de fato, um problema de saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Secretaria da Saúde do Município de Passo Fundo, RS, pelo apoio ao trabalho e pela disponibilização dos dados para o presente estudo. À Professora Claudia Cavalett, pela orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Abstract

Gestational diabetes is set as a variable intolerance to carbohydrates, being detected during the pregnancy. Datas of pregnant indexed to the Parenthood Women's Health Planned at the post service in 2007 and 2008 year in Passo Fundo town were analyzed with the deal to quantify the prevalence of the gestation diabetes, and measure the methods of tracking held in pregnant women. Six hundred eighteen pregnant women at 25 years old or more were measure. The prevalence of gestational diabetes mellitus in this population was 5,6%. All the pregnant women held the glucose at the first appointment of the prenatal. Of all the pregnant women that presented positive tracking, 16 confirmed the disease by the Oral Test of Glucose Tolerance and 6 through the frequency of glucose. After the 20° week of gestation, only 442 came back to held the glucose and 12 pregnant women confirmed gestational diabetes. The data obtained basic health units forward pregnant properly to perform tracing required. However, the problems that the units face is the incorrect filling of the cards, without some datas and without the conduct for the routing in implementing the Oral test of Glucose Tolerance.

Keywords

Pregnancy; Gestational Diabetes Mellitus; Tracking

REFERÊNCIAS

1. SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes - Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes, Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus, 2007. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/>. Acesso em: 27 maio 2009.
2. Basso NAS, et al. Insulinoterapia, controle glicêmico materno e prognóstico perinatal: diferença entre o diabetes gestacional e o clínico. Rev Bras Ginecol Obstet. (online) 2007;29(5):253-9.
3. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MGA. Vias de sinalização da insulina. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002;46(4):419-25.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004;27(5):1047-53.

5. Franco LL. Diabetes: como prevenir, tratar e conviver. 1ª Ed. São Paulo: Elevação, 2005.
6. Mclellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. Rev Nutr. 2007;20(5):515-24.
7. Forti A, et al. In: Vilar L. Endocrinologia clínica. Diabetes Mellitus- Classificação e Diagnóstico. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006 p.540.
8. Pecis, Brugnara, Reichelt In: Gross, et al. Diabetes Mellitus e outras alterações da Tolerância à glicose: Diagnóstico e Classificação. Porto Alegre : Artmed, p. 19, 2004.
9. Miranda PAC, Reis R. Diabetes mellitus gestacional. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Rev Assoc Med Bras. 2008;54(6).Nov/Dec. 2008
10. Rudge MVC; Calderon IMP. A responsabilidade do obstetra sobre o diagnóstico e o tratamento do diabete melito gestacional. Rev Bras Ginecol Obstet. 2006;28(10):571-4.
11. Folly CS. Importância da Glicemia Capilar após Teste de Sobrecarga com 50g de Glicose na avaliação da macrosomia fetal: estudo de caso em gestantes de Caratinga-MG. 2006. Dissertação- Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina Departamento de Ginecologia & Obstetrícia Programa de Pós-Graduação-Saúde da Mulher, 2006.
12. Reichelt AJ, Oppermann MLR, Schmidt MI. Recomendações da 2a. Reunião do Grupo de Trabalho em Diabetes e Gravidez. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002;46(5):574-81.
13. Schmitt et al. Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim - SC. Rev Bras de Anal Clín. 2009;41(1):43-5.
14. Ayach, et al. Associação glicemia de jejum e fatores de risco como teste para rastreamento do diabete gestacional. Rev. Bras. Saúde Matern Infant. 2005;5(3):329-35.
15. Lucas MJ. Diabetes complicating pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am. 2001;28(3):513-36.
16. Valladares CG, Komka SB. Prevalência de diabetes mellitus gestacional em gestantes de um centro de saúde de Brasília - DF. Com Ciências Saúde. 2008;19(1):11-7.
17. Miranda PAC, Reis R. Diabetes Mellitus Gestacional. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes. 2006.
18. Gross JL, et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002; 46(1):16-26.
19. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. Diabetes Care. 1998; 21 Suppl 2:B161-7.
20. SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes- Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes, 2008. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/>. Acesso em: 27 maio 2009.
21. DATASUS. Programa de Humanização no Pré-Natal e Nascimento. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/sisprenatal>. Acesso em: 07 out 2009.
22. Ministério Da Saúde. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus. Disponível Em: <[Http://Portal.Saude.Gov.Br/Saude/](http://Portal.Saude.Gov.Br/Saude/)>. Acesso Em: 16 Fev 2009.
23. American Diabetes Association. Gestational Diabetes. Disponível em: <http://www.diabetes.org/>. Acesso em: 14 abr 2009.
24. Katz L, et al. Análise Comparativa de Testes Diagnósticos para Diabete Gestacional. Rev Bras Ginecol Obstet. 2002;24(8): 527-33.
25. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Assistência pré-natal parte II. Rev Assoc Med Bras. 2007; 53(6).
26. Programa de Humanização no Pré-natal e Nascimento do Ministério da Saúde no Brasil: resultados iniciais. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2004;20(5):1281-9.

Correspondência

Marina Koppe

Rua 1º de Maio 154 apto 702 - Centro
99500-000 – Carazinho, RS
ma_koppe@yahoo.com.br

Avaliação laboratorial de pacientes que fazem uso de isotretinoína oral para o tratamento da acne grave

Laboratory evaluation of patients using oral isotretinoin for severe acne treatment

Raflo Cavalcanti de Medeiros¹

Valéria Cristina Ribeiro Dantas²

Maria de Fátima Pedroza Pinto Barbosa³

Irismar Freire de Queiroz Figueiredo⁴

Sírio André de Mesquita Silva⁴

Resumo

Objetivo: A acne é, frequentemente, uma manifestação temporária da puberdade, correlacionando-se mais com a idade puberal do que com a idade cronológica. A isotretinoína é um composto retinoide (ácido 13-cis-retinoico) derivado da vitamina A, sendo indicada para o tratamento da acne cística severa e acne conglobata resistente a outras formas de tratamento. A pesquisa teve como objetivo identificar a presença de alterações lipídicas, hepáticas, nos processos de coagulação e presença de anemia em pacientes que fizeram uso de isotretinoína oral para o tratamento da acne grave. **Método:** Essa pesquisa caracterizou-se por um estudo exploratório, aberto, prospectivo da análise de exames laboratoriais de trinta pacientes que fizeram uso de isotretinoína oral. **Resultados:** As concentrações de colesterol e triglicérides apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente), quando analisados os resultados dos exames realizados antes do tratamento e após três meses do início do uso da isotretinoína oral. Os resultados de AST, ALT, contagem de plaquetas, hematócrito de hemoglobina estavam dentro dos valores de referências, porém, foram observadas alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$ para todos os parâmetros). **Conclusão:** Pode-se concluir que é relevante o acompanhamento laboratorial mensal de cada paciente e que este contribui de forma direta para a manutenção de valores laboratoriais basais durante o tratamento oral com a isotretinoína.

Palavras-chave

Isotretinoína; Triglicérides; Aspartato aminotransferases

INTRODUÇÃO

A acne é uma enfermidade genética, hormonal e inflamatória dos folículos pilosebáceos da face, das costas e tórax, cuja expressão clínica é dependente de vários fatores. Habitualmente, aparece na puberdade quando a estimulação androgênica promove a hiperprodução de sebo, com hiperqueratinização folicular, colonização por bactérias Gram-positivas (*Propionibacterium acnes*) e inflamação local.⁽¹⁾ Do ponto de vista clínico, a intensidade da acne varia desde formas mais leves (cistos pilosebáceos dilatados que contêm sebo, epitélio queratinizado, bactérias e leveduras comensais), às formas graves e desfigurantes que formam nódulos e fistulas com intensa reação inflamatória. A cicatrização ocorre seguida da formação de queloides, sobretudo em pacientes da raça negra.⁽²⁾ Antes da década de 1940, não havia tratamento efetivo para a acne. Aguardava-se a cura espontânea ou prescreviam-se as poucas opções existentes, tais como substâncias

tópicas de baixa eficácia, como enxofre, resorcina, ácido salicílico, e tratamentos sistêmicos ineficazes, como cálcio, auto-hemoterapia, arsênico e radioterapia, que controlavam a doença, produzindo atrofia da pele e das glândulas sebáceas, porém causavam efeitos adversos sérios e tardios decorrentes do dano acumulativo tipo actínico, radiodermite crônica e até câncer de tireoide.⁽³⁾

Atualmente, a compreensão da etiopatogenia da acne ampliou-se de modo considerável. Além dos fatores já bem conhecidos, como a predisposição genética, o estímulo das glândulas sebáceas pelos andrógenos com hipersecreção, a hiperqueratinização folicular, a colonização bacteriana dos folículos, principalmente pelo *Propionibacterium acnes*, desenvolveram-se muitas pesquisas sobre o papel da imunidade inata e adquirida e da inflamação. Esses conhecimentos norteiam o tratamento e todas as opções terapêuticas disponíveis atualmente.^(4,5)

A isotretinoína é um composto retinoide derivado da vitamina A, quimicamente conhecida como ácido 13-

¹Professor Msc/Universidade Potiguar (Professor pesquisador) – Natal, RN.

²Professor Msc/Universidade Potiguar – Natal, RN.

³Professor Doutor/Universidade Potiguar – Natal, RN.

⁴Graduando Curso Farmácia/Universidade Potiguar – Natal, RN.

cis-retinoico, contendo não menos que 98% e não mais que 120% de $C_{20}H_{28}O_2$.⁽⁶⁾

Em 1955, foi sintetizada a isotretinoína e sua utilização no tratamento da acne inflamatória grave, dos tipos cística e conglobata, iniciou-se, em 1976, na Europa e, em 1980, nos Estados Unidos. No Brasil, as observações iniciaram-se, em 1982. Em 1985, fez-se a primeira publicação brasileira, relatando a experiência em 25 pacientes tratados com doses variadas, pois ainda não havia consenso. O resultado foi excelente, em 24 desses casos, e regular em apenas um. O seguimento desses pacientes, por muitos anos, revelou apenas dois casos de recidiva.⁽³⁾

A isotretinoína é muito eficaz contra a acne (cística e conglobata) porque combate às erupções em todas as frentes importantes. Reduz o tamanho das glândulas sebáceas, o que restringe drasticamente a produção de sebo, diminui o acúmulo de células que levam aos comedões nos folículos sebáceos, destrói a população das bactérias *P. acnes* e controla a inflamação.⁽⁷⁾

As contraindicações relativas ao uso dessa droga são obesidade com distúrbio de colesterol ou triglicérides, diabetes insulino dependente, doenças hepáticas, renais ou sistêmicas, epilepsia, depressão e psicose. Para o controle dessas condições, devem ser realizados exames clínicos e laboratoriais mensais. A contraindicação absoluta para a prescrição da isotretinoína oral é a gravidez, já que o maior problema relacionado a essa droga é a teratogenicidade. O risco de gravidez deve ser excluído antes de se iniciar o tratamento e controlado pela administração de anticoncepcional oral, quando necessário, durante todo o tratamento e até trinta dias após a suspensão da droga. É importante aguardar a menstruação para iniciar o tratamento e enfatizar que não existem riscos para gestações futuras.^(8,9)

O uso de isotretinoína oral apresenta restrições relacionadas, principalmente, a efeitos hepáticos e mudanças no perfil lipídico. Na clínica diária, apesar de raramente ser motivo de interrupção do uso da isotretinoína, a elevação dos triglicérides, não raramente, gera preocupação, levando à redução das doses utilizadas até a normalização laboratorial.⁽¹⁰⁾

Diante do exposto, observou-se a necessidade de se avaliar laboratorialmente os pacientes em início de tratamento com isotretinoína oral a fim de identificar possíveis alterações lipídicas, hepáticas nos processos de coagulação e presença de anemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados exames laboratoriais de trinta pacientes de ambos os sexos, com idades variando de 14 a 50 anos ($20,1 \pm 6,6$ anos), que estavam em tratamento farmacológico com isotretinoína oral. Foi preenchido um protocolo de pesquisa contendo dados de identificação e indicação clínica do paciente, o qual foi utilizado para notificação dos exames laboratoriais. Como critério de inclusão, considerou-

se o diagnóstico de acne grave (cística, conglobata e fulminans), critério básico e primordial para o uso do medicamento. Para exclusão da pesquisa, tomou-se como parâmetros a gestação, amamentação, hipersensibilidade à isotretinoína ou parabenos, insuficiência hepática, alterações no metabolismo dos lipídios, expressas pelo nível sérico de triglicérides acima de 500 mg/dL ou nível sérico de colesterol acima de 300 mg/dL, e ausência de condições de compreender e executar as orientações médicas. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Potiguar e todos os indivíduos participantes da pesquisa ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após serem informados sobre o protocolo de estudo.

A pesquisa se baseou em um estudo exploratório, aberto, prospectivo de série de casos, através da análise de exames laboratoriais, onde foram anotados, em planilha específica, dados como sexo, idade, concentração de colesterol, triglicérides, glicose, aspartato-aminotransferases (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), contagem de plaquetas, tempo de protrombina, hematócrito e hemoglobina de todos os pacientes, antes do início do tratamento e três meses após o uso da isotretinoína oral.

Todos os resultados dos exames laboratoriais foram submetidos a cálculos estatísticos, sendo utilizado o programa Statistica versão 7.0. De início, todos os dados passaram por uma análise de normalidade com o intuito de verificar se estes provinham de uma distribuição normal. A normalidade foi calculada pelo teste de *Shapiro-Wilk's W test*. Quando os dados apresentavam distribuições normais, empregou-se um teste paramétrico para calcular o valor de *p*, o teste usado foi o Teste T para variáveis dependentes, e quando os dados não partiam de uma distribuição normal, o teste usado para calcular o valor de *p* foi o teste de Wilcoxon, que é um teste não paramétrico.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a distribuição dos trinta pacientes agrupados em seis faixas etárias, onde a acne foi mais comum em pacientes jovens, compreendendo as idades entre 17-19 anos, totalizando 46,67% (14 pacientes), enquanto na faixa etária de 23-25 anos não foi observado nenhum paciente. Com relação ao sexo, observou-se predominância de pacientes masculinos, nas primeiras faixas etárias 14-16 e 17-19 anos, com um total de três e nove pacientes, respectivamente, enquanto que, nas últimas faixas etárias, foi observado apenas o sexo feminino.

O perfil lipídico e glicídico dos trinta pacientes, antes e três meses após o uso de isotretinoína oral (Tabela 2), mostra diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias de colesterol e triglicérides, 145,13 e 175,40 mg/dL, 85,91 e 117,73 mg/dL ($p < 0,05$ e $p < 0,05$), respectivamente. A concentração média de glicose, antes e três meses depois do tratamento, foi de 81,03 e 79,04 mg/dL, respectivamente, e não

foi observada diferença estatisticamente significativa ($p= 0,22$).

Os resultados de AST e ALT (Tabela 3) encontram-se dentro dos valores de referência antes e três meses depois de uso do medicamento, porém, observou-se alteração estatisticamente significativa, $p<0,05$ para ambos.

A Tabela 4 revela a contagem média de plaquetas e o tempo de protrombina (TP) dos pacientes antes e três meses depois do tratamento com isotretinoína oral, onde foi observada elevação do número de plaquetas de 252.267 para 259.200 plaquetas/mm³. A alteração apresentada mostra-se com significância estatística, $p<0,05$.

As concentrações médias de hematócrito e hemoglobina dos pacientes antes e três meses depois do tratamento com isotretinoína oral mostraram uma diminuição com significância estatística, $p<0,05$ para ambos os parâmetros (Tabela 5).

Tabela 1 - Faixa etária, número de pacientes e frequência do sexo

Faixa etária dos pacientes	Número de pacientes	Porcentagem (%)	Feminino	Masculino
14-16 anos	5	16,67	40% (2)	60% (3)
17-19 anos	14	46,67	35,71% (5)	64,29% (9)
20-22 anos	6	20	66,67% (4)	33,33% (2)
23-25 anos	0	0	-	-
26-28 anos	4	13,33	100% (4)	0%
Maior que 29 Anos	1	3,33	100% (1)	0%
Total	30	100%	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 2 - Concentração média do colesterol, triglicerídeos e glicose antes e três meses depois do uso de isotretinoína oral

Análise realizada	Concentração média (mg/dL)
Colesterol	
Antes	145,13
Depois	175,40
Triglicerídeos	
Antes	85,91
Depois	117,73
Glicose	
Antes	81,03
Depois	79,04

$p(\text{colesterol}) < 0,05$ $p(\text{triglicerídeos}) < 0,05$ $p(\text{glicose}) = 0,22$

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 - Atividade média de AST e ALT antes e três meses depois de tratamento com isotretinoína oral

Análise realizada	Concentração média (U/L)
AST	
Antes	22,32
Depois	27,76
ALT	
Antes	19,82
Depois	24,06

$p(\text{AST}) < 0,05$ $p(\text{ALT}) < 0,05$

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4 - Contagem média de plaquetas e TP antes e três meses depois do tratamento com isotretinoína oral

Período	Contagem média de plaquetas (mm ³)	Tempo de Protrombina (seg)
Antes	252.267	12,94
Depois	259.200	12,98

$p(\text{plaquetas}) < 0,05$ $p(\text{TP}) = 0,29$

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5 - Média das concentrações de hematócrito e hemoglobina dos pacientes antes e três meses depois do tratamento com isotretinoína oral

Período	Hematócrito %	Hemoglobina (g/dL)
Antes	42,16	14,53
Depois	39,03	13,38

$p(\text{hematócrito}) < 0,05$ $p(\text{hemoglobina}) < 0,05$

Fonte: Dados da pesquisa

DISCUSSÃO

Foi observada uma maior frequência de acne entre os adolescentes na faixa etária de 14 a 19 anos e, nas demais faixas, o número de pacientes foi reduzido. De acordo com estudos epidemiológicos realizados por Dreno et al.,⁽¹¹⁾ a acne é uma condição bastante comum, afetando cerca de 80% dos jovens entre 12 e 18 anos de idade, surgindo cada vez mais precocemente, a partir dos 12 anos de idade. A acne não atinge apenas adolescente, podendo persistir na fase adulta.⁽¹²⁾ Habitualmente, a acne aparece na puberdade, quando a estimulação androgênica promove a hiperprodução de sebo, com hiperqueratinização folicular, colonização por bactérias Gram-positivas e inflamação local.⁽¹⁾ A acne atinge ambos os sexos, com uma maior persistência nos pacientes do sexo feminino. Com relação ao sexo, observou-se predomínio de pacientes masculinos nas primeiras faixas etárias, enquanto que o sexo feminino foi mais frequente e predominante a partir da terceira faixa etária.⁽¹³⁾

O perfil lipídico dos trinta pacientes estudados mostrou elevação nas concentrações do colesterol e triglicerídeos. Estudo realizado por Schmitt et al.⁽¹⁰⁾ mostrou que, dos noventa pacientes analisados, 28% desenvolveram alterações nos triglicerídeos e 13%, no colesterol. Borges et al.⁽¹⁴⁾ constataram que 20% dos pacientes em tratamento com isotretinoína apresentaram elevação nos níveis de colesterol. Entretanto, na maioria dos casos sem orientação dietética adjuvante, o perfil lipídico é restaurado apenas com o término do tratamento, atingindo os valores controles dentro de 2 a 4 semanas

Em termos de aumentos relativos, os acréscimos nos níveis lipídicos se enquadram dentro dos limites clínicos de normalidade. Apesar destas alterações poderem aumentar o risco de doenças cardiovasculares, o tempo de tratamento, em pessoas jovens, não é suficiente para aumentar o risco de aterosclerose. No entanto, se o

tratamento for efetuado por períodos muito prolongados, em pacientes de risco, com hipercolesterolemia, o risco de virem a desenvolver doenças cardiovasculares encontra-se aumentado.⁽¹⁵⁾ As alterações relativas às variações de triglicérides e de colesterol podem ser atenuadas, através da alteração de hábitos alimentares, perda de peso e redução da dose de isotretinoína.

Os aumentos nas aminotransferases foram observados no primeiro mês de tratamento. Após os dois primeiros meses, os pacientes não desenvolveram alterações desses parâmetros. Aumentos discretos são descritos em 5% a 35% dos pacientes e essas anormalidades bioquímicas são reversíveis, interrompida a medicação.⁽¹⁴⁾

Estudo realizado por Brito et al.,⁽¹⁶⁾ em 150 pacientes submetidos a tratamento com isotretinoína, mostrou variação discreta, quase insignificante, das enzimas hepáticas. Nessa pesquisa, evidenciou-se elevação nos níveis das aminotransferases, embora tenha ficado dentro dos valores de referência. Entretanto, estes resultados podem significar a necessidade de uma maior atenção aos pacientes com risco de hepatotoxicidade aumentada, como nos casos de consumo excessivo de álcool, antecedente de hepatopatia e terapia medicamentosa concomitante.

De acordo com Borges et al.,⁽¹⁴⁾ o mecanismo exato pelo qual a isotretinoína causa elevação nas enzimas hepáticas é desconhecido. Acredita-se que os ácidos retinoides livres alterem a síntese de glicoproteína ou a expressão genômica e produzam lesão na membrana celular dos hepatócitos.

Zane et al.,⁽¹⁷⁾ avaliando alterações laboratoriais, durante o uso de isotretinoína oral, afirmaram que a contagem de plaquetas não sofreu alterações, enquanto dados desta pesquisa mostraram elevação das plaquetas apesar de estarem dentro dos valores de referência. Quanto aos resultados médios do tempo de protrombina, antes e três meses depois do tratamento com isotretinoína oral, neste trabalho, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Nesta pesquisa foram observadas alterações no hematócrito e hemoglobina quando comparados os resultados antes e três meses após o início do tratamento com isotretinoína oral. Borges et al.⁽¹⁴⁾ afirmam que o uso da isotretinoína leva a alterações laboratoriais, devido à toxicidade hepática e hematológica, além das dislipidemias.

CONCLUSÃO

O tratamento da acne justifica-se pela possibilidade de evitar lesões cutâneas, aparecimento ou agravamento de transtornos psicológicos ocasionados pelas lesões. Os resultados obtidos através dessa pesquisa mostram a necessidade do acompanhamento laboratorial dos pacientes em uso de isotretinoína oral, a fim de monitorar o perfil lipídico e hepático.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Unidade Central de Agentes Terapêuticos do Rio Grande do Norte pela disponibilização dos dados de seu arquivo.

Abstract

Objective: Acne is commonly, a temporary manifestation of puberty, more correlated with pubertal age than with chronological age. The isotretinoin is a retinoid compound derived from vitamin A, chemically known as 13-cis-retinoic, it is indicated for the treatment of severe cystic acne and conglobata acne resistant to others ways of treatment. The research aimed to identify the presence of lipid disorders, hepatic, and coagulation processes and the presence of anemia in patients who used oral isotretinoin for the treatment of severe acne. **Methods:** This research was based on an exploratory, open, prospective through laboratory analysis of thirty patients treated with isotretinoin. **Results:** The concentrations of cholesterol and triglycerides showed significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.05$, respectively), when analyzing the results of tests performed before treatment and three months after the initial oral use of isotretinoin. The results of AST, ALT, platelet count and hemoglobin hematocrit values were within the reference, however, statistically significant changes were observed, $p < 0.05$ for all parameters. **Conclusion:** It can be concluded that monthly laboratory monitoring of each patient is relevant, and that this contributes directly to the maintenance of baseline laboratory values during oral treatment with isotretinoin.

Keywords

Isotretinoin; Triglycerides; Aspartate aminotransferases

REFERÊNCIAS

- Diniz DGA, Lima EM, Filho NRA. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. Rev Bras Cien Farm. 2002; 38(4):415-429.
- Organización Mundial de La Salud. Acne vulgar: Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos. Medicamentos utilizados em lãs enfermedades cutâneas. Genebra: OMS, 1999; 59-63.
- Sampaio SAP, Bagatin E. Experiência de 65 anos no tratameto da acne e de 26 anos com isotretinoína oral. An Bras Dermatol. 2008;83(4):361-7.
- Koreck A, Pivarsci A, Dobozy A, Kemény L. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. Dermatology. 2003;206(2): 96-105.
- Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, et al; Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. J Am Acad Dermatol. 2003;49(1 Suppl):S1-3.
- Alves CPI, Diniz DGA, Lima EM. Estudo da encapsulação de isotretinoína em lipossomas. Rev Elet Farmácia. 2007;4(1):79-85.
- Preston L, Macedo O. Acne tem cura. São Paulo: Globo; 2007.
- Wiegand UW, Chou RC. Pharmacokinetics of oral isotretinoin. J Am Acad Dermatol. 1998;39(2 Pt 3):S8-12.
- Nau H. Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. J Am Acad Dermatol. 2001; 45(5):S183-7.
- Schmitt JV, Cerci FB, Tavares M. Mulheres adultas com acne apresentam maior risco de elevação de triglicérides ao uso de isotretinoína oral. An Bras Dermatol. 2011;86(4):807-10.
- Dreno B, Daniel F, Allaert FA, Aube I. Acne: evolution of the clinical practice and therapeutic management of acne between 1996 and 2000. Eur J Dermatol. 2003;13(2):166-70.

12. Dhir R, Gehi NP, Agarwal R, More YE. Oral isotretinoin is as effective as a combination of oral isotretinoin and topical anti-acne agents in nodulocystic acne. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008; 74(2):187.
13. Vaz AL. Acne vulgar: bases para o seu tratamento. *Rev Port Clin Geral.* 2003;19:561-70.
14. Borges MB, Ribeiro RKB, Costa FPP, Cavalcante JC. Avaliação laboratorial do perfil lipídico e testes de lesão hepatocelular em pacientes com acne vulgar sob uso de isotretinoína oral. *Rev Bras Clin Med.* 2011;9(6):397-402.
15. Hanson N, Leachman S. Safety issues in isotretinoin therapy. *Semin Cutan Med Surg.* 2001;20(3):166-83.
16. Brito MFM, Galindo JCS, Santos JB, Sant'anna IP, Rosendo LHP. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. *An Bras Dermatol.* 2010;85(3):331-7.
17. Zane LT, et al. Uma análise populacional de anormalidades laboratoriais durante a terapia com isotretinoína para acne vulgaris. *Arch Dermatol.* 2006;142(8):1055-7.

Correspondência

Ralfo Cavalcanti de Medeiros

Universidade Potiguar - UnP

Avenida Nascimento de Castro nº 1597, Dix-Sept Rosado

59054-180 - Natal, RN

Avaliação cariotípica de pacientes com clínica de Síndrome de Down no HUAP-UFF

Karyotypic evaluation of patients with Down syndrome clinic in HUAP-UFF

Raiane Cardoso Chamon¹
Diogo Pereira Dias Santos¹
Plínio Cunha Sathler^{1,2}
Mariana F Figueiredo³
Alan Araújo Vieira⁴
Evelyn Kahn⁴
Maria Camilo⁵
Juan Clinton Llerena⁵
Hye Chung Kang¹

Resumo

O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil cariotípico de pacientes que deram entrada no Hospital Universitário Antônio Pedro-HUAP (Universidade Federal Fluminense), durante o período de 2006 a 2010, com clínica de Síndrome de Down (SD), e determinar a ocorrência de cariótipos clássicos, mosaicismos e translocações. Para avaliação do cariótipo, foi realizada a técnica de bandeamento G, a partir de culturas de linfócitos. Dos 157 pacientes que tiveram avaliação cariotípica solicitada no Laboratório de Hematologia-HUAP, 39 tinham clínica de SD, sendo que 32 apresentavam trissomia do cromossomo 21, um, translocação 21q:21q e, dois, translocação 14q:21q. Dois casos de mosaicismo foram detectados. Duas amostras não foram diagnosticadas como SD. Além disso, dois casos não associados à suspeita clínica de Síndrome de Down foram diagnosticados como trissomia do cromossomo 21. O diagnóstico preciso da SD é fundamental para a orientação clínica adequada dos indivíduos afetados e para o fornecimento de informações relevantes ao planejamento familiar. O presente estudo indica a ocorrência destas alterações genéticas na população encaminhada ao Laboratório de Hematologia-HUAP, para análise do perfil cariotípico, demonstrando que o diagnóstico laboratorial correto é necessário para confirmar a clínica dos pacientes, salientando a importância da interação clínico-laboratorial.

Palavras-chave

Síndrome de Down; Cariótipo; Trissomia; Mosaicismo

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é uma anormalidade cromossômica em que se verifica uma cópia extra do cromossomo 21, podendo ser caracterizada em três cariótipos específicos, a trissomia clássica, com o cromossomo 21 adicional, responsável por 96% dos casos da Síndrome, translocações (2% dos casos) e os mosaicismos (2% dos casos).⁽¹⁾ Além disso, a SD é uma das maiores causas de disfunção mental,⁽²⁾ estando relacionada com anormalidades neurológicas,⁽³⁾ cardiopatias congênitas,⁽⁴⁾ deficiências imunohematológicas, como leucemias,⁽⁵⁾ e déficit cognitivo.

A trissomia completa do cromossomo 21 ocorre devido a um evento não disjuncional, durante a gametogênese, geralmente na primeira divisão celular da meiose.⁽⁶⁾ Segundo Epstein e colaboradores,⁽⁵⁾ um em cada 700 nascidos vivos em todos os grupos étnicos apresentam a trissomia do

cromossomo 21. Além disso, fetos trissômicos apresentam maior risco de aborto.^(7,8) O diagnóstico desta trissomia pode ser realizado no exame pré-natal ou após o nascimento do indivíduo, através da análise cariotípica.

Para elucidar quais genes estão ligados à manifestação das características associadas à SD, estudos de associação genômica e modelos com animais transgênicos têm sido realizados, contribuindo para associação de genes como DYRK1A, que, em sua expressão acentuada, pode resultar em déficit cognitivo.⁽⁹⁾ A incidência precoce da doença de Alzheimer está provavelmente relacionada à triplicação do gene codificador da proteína precursora amiloide, conhecida como fator de risco para o desenvolvimento da doença, presente no cromossomo 21.⁽¹⁰⁾ A trissomia do cromossomo 21 também afeta a hematopoiese, como demonstrado através da expansão da população de progenitores eritroides-megacariócitos no fígado de fetos abortados portadores da SD.⁽¹⁰⁾

¹Laboratório de Hematologia Clínica (MPT), Hospital Universitário Antônio Pedro (Huap), Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói, RJ.

²Programa de Pós-graduação em Patologia – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói, RJ.

³Hospital Universitário Antônio Pedro (Huap), Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói, RJ.

⁴Departamento Materno Infantil – Hospital Universitário Antônio Pedro (Huap), Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói, RJ.

⁵Instituto Fernandes Figueira – Fiocruz, RJ.

*Laboratório de Hematologia Clínica - UFF/HUAP, RJ, Brasil.

Artigo recebido em 18/10/2011

Artigo aprovado em 20/11/2014

No Brasil, pesquisas para se estudar a ocorrência dos diferentes tipos de cariótipos são necessárias para a definição de uma conduta clínica adequada aos familiares que convivem com pacientes com Síndrome de Down.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de 157 pacientes foram encaminhadas ao Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense (UFF), para avaliação do perfil cariotípico, entre o período de 2006 a 2010. Dessas, 138 eram de sangue periférico e as demais eram de líquido amniótico (13), sangue fetal (3), medula óssea (2) e fragmento de endométrio (1). Após a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética (CMM HUAP 16/03), o sangue dos pacientes foi coletado em tubos contendo heparina sódica. A análise do cariótipo foi procedida, segundo o protocolo sugerido por Caspersson e colaboradores,⁽¹⁾ com algumas modificações.

Para a análise do cariótipo, foi necessária a cultura e o processamento de linfócitos, realizada em tubo cônico, contendo 1 mL da amostra do paciente e 4 mL do meio RPMI 1640 com 1 mL de soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell). Além disso, adicionaram-se 100 µL do fator mitogênico fitohemaglutinina (PHA) (Vitrocell) e os tubos foram incubados a 37°C, durante 72 horas. Noventa minutos antes do término da incubação, 100 µL de colchicina (10 UG/mL - Vitrocell) foram adicionados à cultura. Após a incubação, a cultura foi centrifugada, a 1500 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, completou-se o tubo até a marca de 7 mL com solução hipotônica de KCl 0,075 M, incubando por 20 minutos, a 37°C. Após esse tempo, acrescentou-se à cultura cerca de 15 a 20 gotas do fixador de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético), centrifugando a solução, por 10 minutos, a 1500 rpm, com descarte do sobrenadante, o que promoveu a hemólise celular. Esta última etapa foi repetida até o sobrenadante se tornar límpido e o pellet, o mais branco possível. A amostra foi armazenada entre 2 a 8°C.

Para confecção de lâminas, a amostra foi gotejada sobre as mesmas, com o auxílio de uma pipeta, a partir de uma altura entre 40 e 60 centímetros. Posteriormente, as lâminas foram armazenadas, em estufa, a 37°C, de um a três dias, para que o envelhecimento ocorresse, permitindo um melhor resultado no bandamento G.

Decorrido o tempo de envelhecimento, as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina a 0,025%, durante três segundos. Este procedimento foi realizado uma vez para cada dia em que a lâmina foi mantida na estufa durante o envelhecimento. A tripsina desnatura as proteínas cromossômicas, que se tornam passíveis de coloração pelo método de Giemsa, apresentando um padrão de bandas pré-definido. Terminada a digestão, a

lâmina foi mergulhada em solução com tampão fosfato, bloqueando o efeito da tripsina.

A coloração foi feita pelo corante de Giemsa. As lâminas foram, então, mergulhadas na solução em Jarro de Coplin, por 15 minutos, sob agitação. Em seguida, foi feita a lavagem, em água corrente, e, após a secagem, as lâminas foram visualizadas no microscópio.

Foi realizada a análise microscópica de 20 a 50 metáfases, para se obter um resultado significativo. Uma metáfase ideal é aquela em que os cromossomos atingem o maior grau de condensação e se rompem, expondo o cromossomo com pouca ou nenhuma sobreposição. Uma vez encontrada, foram realizadas as contagens dos cromossomos. Após a quantificação, foi feita a análise qualitativa desses cromossomos. Essas análises foram realizadas simultaneamente. A análise qualitativa foi realizada comparando-se os tamanhos e o padrão de bandeamento apresentado por cada cromossomo. A metáfase foi, ainda, fotografada e montada paralelamente para permitir uma melhor comparação das características dos cromossomos.

Os cromossomos foram classificados aos pares, em ordem decrescente de tamanho, e ordenados em sete grupos distintos (A-G). Também foram classificados em relação à posição do centrômero, em metacêntricos (centrômero central), submetacêntricos (centrômero em região intermediária entre o ponto médio e extremidade do cromossomo) e acrocêntricos (centrômero próximo a uma extremidade).

Através da comparação destas características e do padrão de bandeamento exibido por todos os cromossomos, foi possível identificá-los e diagnosticar as anomalias. Os cromossomos sexuais foram classificados à parte, pois no sexo masculino não ocorre formação de pares.

RESULTADOS

Dos 157 pacientes que tiveram avaliação cariotípica solicitada no HUAP-UFF, 39 (24,8%) apresentaram clínica compatível com síndrome de Down, com idades variando entre 1 dia a 18 anos de idade, onde 20 foram do sexo feminino e 19 do sexo masculino.

Por meio da análise dos cariótipos pertencentes aos 39 pacientes com suspeita de SD, 32 casos estavam associados à trissomia simples (82,1%), um caso à translocação 21q:21q (2,6%) e dois casos à translocação 14q:21q (5,1%). Além disso, houve dois casos de moissacismo detectados (5,1%). Entretanto, dois pacientes não obtiveram resultados compatíveis com a trissomia do cromossomo 21, não sendo diagnosticados como portadores da Síndrome de Down (Tabela I).

Dois pacientes com suspeita clínica de outras síndromes genéticas apresentaram cariótipo compatível com Síndrome de Down.

Tabela 1 - Distribuição dos 39 pacientes com clínica de SD de acordo com o resultado obtido após realização do cariótipo e distribuição dos sexos dos pacientes

Resultado	Nº amostras (%)	Sexo	
		Feminino (n)	Masculino (n)
Trissomia simples	32 (82,1%)	16	16
Mosaicismo	2 (5,1%)	-	2
Translocação 14q:21q	2 (5,1%)	1	1
Translocação 21q:21q	1 (2,6%)	1	-
Não apresentaram trissomia	2 (5,1%)	2	-
Total de amostras	39	20	19

DISCUSSÃO

As malformações congênitas e as doenças genéticas estão incluídas entre as principais causas de mortalidade infantil nos países da América Latina. Contudo, estas não recebem a devida atenção das esferas governamentais, em parte porque os principais problemas de saúde que determinam morbidade e mortalidade infantil possuem origem socioeconômica e ambiental.⁽¹²⁾ Estima-se que as anomalias cromossômicas atinjam, no mínimo, 7,5% de todas as concepções, no entanto, a maior parte destes conceitos sofre abortos espontâneos.⁽⁷⁾ Considera-se, ainda, que a frequência de aberrações cromossômicas, em abortos, seja ao redor de 50% e, entre os nativos, 0,6%.⁽¹³⁾

Estudos mostram que a frequência de aberrações cromossômicas para SD detectada em abordagens similares às do presente trabalho, como aqueles realizados no Laboratório de Citogenética do Hospital Universitário da UFSC, no Laboratório de Citogenética Humana da Unicamp e no Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ, apresentam valores compatíveis (22%, 32,9% e 37,9%, respectivamente) com a frequência encontrada no Hospital Universitário Antônio Pedro, da UFF (24,8%), onde foi conduzida esta pesquisa.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

A Síndrome de Down (SD) é a causa genética mais comum de déficit cognitivo na população, ocorrendo em um a cada 700 recém-nascidos vivos.^(17,18) A trissomia do 21 (47,X*,+21), o cariótipo mais comum da SD, é causada por um evento meiótico não disjuntivo. Durante a meiose, a ocorrência desse evento previne a separação adequada dos cromossomos homólogos ou das cromátides irmãs.⁽¹⁹⁾ A maioria dos casos de síndrome de Down (~96%) é devida à trissomia livre do cromossomo 21,⁽¹⁾ com a maior parte das não disjunções proveniente do gameta materno. Esta maior frequência da trissomia livre do cromossomo 21 também foi evidenciada, neste estudo, que relata que, dos 37 pacientes com diagnóstico confirmado de SD, 32 apresentaram trissomia livre do cromossomo 21 (86,5%).

Os fenótipos de translocação ocorrem quando uma cópia extra do cromossomo 21 está presente em todas as células do indivíduo, acoplado a outro cromossomo (14 ou 21).⁽²⁰⁾ Todas as outras configurações, diferentes das encon-

tradas nos cromossomos 14 e 21, são letais. A síndrome de Down por translocação ocorre em ~2% dos casos.⁽¹⁾ Sua prevalência é a mesma em gametas femininos e masculinos e não é afetada pela idade dos pais. Entretanto, no presente estudo, verificamos que o número de casos de translocação entre os 37 indivíduos com SD foi de 10,8%, valor elevado em relação aos valores encontrados na literatura.

Casos de mosaicismos podem ocorrer após a concepção, durante o início das divisões celulares mitóticas, levando apenas uma parte das células do corpo a apresentarem a trissomia do 21 (mosaicismo mitótico), ou quando um embrião é formado a partir de um zigoto trissômico; contudo, uma linhagem de células perde a cópia extra do cromossomo 21 e reverte para o arranjo cromossômico normal (mosaicismo meiótico). Há grande variabilidade na fração de células do corpo que apresentam a trissomia. Esta é a causa de ~2% a 4% de todos os casos de síndrome de Down observados.⁽²¹⁾ Na presente avaliação, os dados obtidos em relação aos casos de mosaicismos, dentre as 37 amostras, foi de 5,4%, valor compatível aos verificados na literatura.

CONCLUSÃO

O diagnóstico preciso da SD é fundamental para a adequada orientação clínica aos pacientes e familiares com respeito ao risco de recorrência na própria família. Este trabalho mostra a incidência dessas alterações na população atendida no HUAP-UFF. A alta frequência de anomalias, nesta população, demonstra o correto encaminhamento, por parte dos clínicos, e reflete a necessidade de expansão dessa atividade, destacando a interação entre a clínica e o laboratório.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Docente (Capes) e Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Fluminense (UFF) pelo apoio financeiro e bolsas.

Abstract

The objective of this study was to analyze the karyotypic profile of patients admitted to Antônio Pedro University Hospital-APUH (Fluminense Federal University) during the period 2006 to 2010, with Down syndrome (DS) suspect, and determine the occurrence of classical karyotypes, mosaicism and translocations. To assess the karyotype a G banding technique was performed from cultures of lymphocytes. Of the 157 patients that requested karyotypic assessment on the Hematology Laboratory-APUH, 39 had DS clinic, of which 32 presented trisomy of chromosome 21, one had a translocation of 21q:21q, and two patients had 14q:21q translocation. Two cases of mosaicism were detected. Besides, two cases not associated with clinical suspicion of DS were diagnosed as trisomy of chromosome 21. Accurate diagnosis of

Down syndrome is critical to proper clinical management of affected individuals, as well as to provide relevant information to family planning. The present study indicates the occurrence of these genetic changes in populations served and referred to the Hematology Laboratory - APUH for karyotypic analysis of the profile, and demonstrates that the correct laboratory diagnosis is needed to confirm the clinical assessment of patients, stressing the importance of clinical-laboratory interaction.

Keywords

Down Syndrome; Karyotype; Trisomy; Mosaicism

REFERÊNCIAS

1. Bomfim RV. Educação Física e a criança com Síndrome de Down: algumas considerações. Integração, São Paulo. 1996;7 (16):60-63.
2. Down JL. Observations on the ethnic classification of idiots. London Hospital Clinical Lectures and Reports 3:259-62, 1886.
3. de A Moreira LM, San Juan A, Pereira PS, de Souza CSA case of mosaic trisomy 21 with Down's syndrome signs and normal intellectual development. J Intellect Disabil Res. 2000;44 (Pt 1):91-6.
4. Cooley WC, Graham JM Jr. Down syndrome: An update and review for the primary pediatrician. Clin Pediatr (Phila). 1991; 30(4):233-53.
5. Epstein CJ, Korenberg JR, Annerén G, Antonarakis SE, Aymé S, Courchesne E, et al. Protocols to establish genotype-phenotype correlations in Down syndrome. Am J Hum Genet. 1991;49(1): 207-35.
6. Karkany J. Congenital Malformations. Chicago. Year Book Medical Publishers, Inc.: 319-322, 1971.
7. Baird PA, Sadovick AD. Life tables for Down syndrome. Hum Genet. 1989;82(3):291-2.
8. McCabe LL, McCabe ER. Down syndrome: Issues to consider in a national registry, research database and biobank. Mol Genet Metab. 2011;104(1-2):10-2.
9. Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, et al. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. Nature. 2009;459 (7250):1126-30.
10. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VL, Fisher EM. Down syndrome - recent progress and future prospects. Hum Mol Genet. 2009;18(R1):R75-83.
11. Caspersson T, Zech L, Modest EJ, Foley GE, Wagh U, Simonsson E. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. Exp Cell Res. 1969; 58(1): 128-40.
12. Organization Panamericana De La Salud (OPS): Prevención y control de las enfermedades genéticas y los defectos congénitos. Publicación Científica N° 460, Washington, D.C., 1984.
13. Coonor JM, Ferguson-Smith MA. Essential Medical Genetics. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, London. 1991
14. Basei FL, Maciel FSA, Wagner G, Nuernberg A, Liz TS, Pereira ET, et al. Avaliação e caracterização de aberrações cromossômicas no laboratório de citogenética do hospital universitário-UFSC. Extensio v.1 n.0 2004.
15. Dovigo JRD. Análise da casuística não oncológica do laboratório de genética humana do Departamento de Genética Médica FCM-UNICAMP (1970-1999). 2001. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
16. Santos CB, Boy RT, Santos JM, Silva MPS, Pimentel MMG. Chromosomal investigations in patients with mental retardation and/or congenital malformations. Genet Mol Biol. 2000; (23):703-7.
17. Grouchy JD, Turleau C. Trissomie 21. Atlas des Maladies Chromossomiques. 12a ed, 340-347, 1982.
18. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The methabolic basis of inherited disease. 1989. 6th Ed, McGraw-Hill Book Company.
19. Epstein CJ. Down Syndrome (trisomy 21), apud Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. McGraw-Hill, Inc., NewYork, p. 1223-1256, 2001.
20. Hartway S. A Parent's Guide to the Genetics of Down Syndrome. Adv Neonatal Care. 2009;9(1):27-30.
21. Kaminker P, Romina A. Síndrome de Down. Primera parte: enfoque clínico-genético. Arch Argent Pediatr. 2008;106(3):249-59.

Correspondência

Hye Chung Kang

Departamento de Patologia

Laboratório de Hematologia – Universidade Federal Fluminense

Rua Marques de Paraná, no. 303, 4º. Andar, sala 14

24033-900 – Niterói, RJ, Brasil

hyekang@vm.uff.br

Avaliação de sódio, potássio e cloretos em diferentes tipos de amostras empregando uma metodologia ISE direto

Evaluation of sodium, potassium and chloride in different types of samples using Direct Method ISE

Carolina Cella Conter¹

Cristiane Munaretto Ferreira²

Mariana Waterkemper Andrade Barcella²

Rodrigo Allan Barcella²

Edson Antonio Alves da Silva³

Paulino Yassuda-Filho⁴

Resumo

A tecnologia do eletrodo íon-seletivo (ISE) direto determina a concentração de eletrólitos no componente plasmático do sangue total ou em outros tipos de amostras não diluídas. Este estudo objetivou determinar a ocorrência de diferenças significativas entre os resultados de sódio, potássio e cloretos obtidos por um analisador de gases sanguíneos/eletrólitos integrados, método ISE direto, entre amostras de soro e de sangue total arterial. Foi feito um estudo retrospectivo, prospectivo, quantitativo, por meio de busca de dados em arquivo do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP). Nesta pesquisa, foram incluídas 206 amostras de pacientes admitidos no HUOP de diferentes setores, de ambos os gêneros e com idade variada. Todos os resultados foram comparados pelo Teste de Wilcoxon, com um $p \leq 0,05$ indicando significância estatística. Observou-se diferença significativa entre os valores dos constituintes potássio ($p=0,0003$) e sódio ($p=0,035$) obtidos a partir de soro e sangue total arterial, pelo método ISE direto. Porém, não houve diferença significativa entre os valores de cloretos obtidos a partir desses dois tipos de amostras.

Palavras-chave

Eletrodo íon seletivo; Eletrólitos; ISE direto

INTRODUÇÃO

O equilíbrio dos íons nos tecidos é de grande importância fisiológica, pois as alterações eletrolíticas quase sempre se manifestam como múltiplos distúrbios, exigindo avaliação criteriosa do estado clínico geral do paciente e abordagem terapêutica apropriada.⁽¹⁻⁴⁾

Sensores eletroquímicos são adequados para as determinações de metabólitos de interesse na química clínica, pois apresentam maior sensibilidade, seletividade, portabilidade, menor tempo de resposta e baixo custo.⁽⁵⁾

Dentre as técnicas eletroquímicas, a potenciometria é a mais comumente empregada e envolve a medida de um potencial gerado por uma célula sob condições essenciais de equilíbrio.⁽⁶⁾ Desta forma, a potenciometria, utilizando eletrodos íon-seletivo (ISE), pode oferecer uma maneira mais simples e conveniente de determinar os valores fisiologicamente ativos das espécies iônicas.⁽⁷⁾ Estas determinações podem ser feitas por duas metodologias, o ISE DIRETO e o ISE INDIRETO.⁽⁸⁾

A tecnologia ISE direto determina os eletrólitos no componente plasmático do sangue total ou em amostras não diluídas, como, por exemplo, soro, plasma ou outros fluidos biológicos.⁽¹⁾ Este tipo de tecnologia é empregado, predominantemente, em analisadores "point-of-care" (POCT), tradicionalmente referidos como analisadores de gases sanguíneos, e em alguns analisadores laboratoriais.^(8,9)

Para as tecnologias ISE direto, as amostras não diluídas são fornecidas ao equipamento que mede a atividade ou a fração fisiologicamente relevante do íon de interesse, não sendo afetado pelas mudanças das concentrações dos sólidos, como lipídios ou proteínas.⁽⁸⁾

Na tecnologia ISE indireto, a amostra de plasma, soro ou líquidos biológicos sofre uma diluição prévia com um diluente que apresenta determinada força iônica antes que sejam medidas as concentrações.^(8,9)

Muitos estudos têm demonstrado existir diferenças entre as determinações das concentrações dos eletrólitos sódio, potássio e cloretos, quando há variação no tipo de

Estudo realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná – HUOP – Cascavel, PR.

¹Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Cascavel, PR.

²Pós-graduandos do Curso de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade Assis Gurgacz – Cascavel, PR.

³Professor doutor do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Cascavel, PR.

⁴Professor assistente da disciplina de Bioquímica Clínica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Cascavel, PR.

Artigo recebido em 01/09/2011

Artigo aprovado em 20/11/2014

matriz da amostra, e frente às variáveis pré-analíticas, como conteúdo de amostra (drogas, metabólitos e produtos à base de plantas), coleta de amostras, local de coleta (arterial, venosa, capilar), tratamento e armazenamento da amostra.⁽⁸⁾

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se houve diferenças entre os resultados dos eletrólitos sódio, potássio e cloretos obtidos por um analisador de gases sanguíneos/eletrólitos integrados (metodologia ISE direto), a partir de dois tipos de amostras, soro e sangue total arterial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo e prospectivo, quantitativo, com 206 amostras de sangue de pacientes admitidos no Hospital Universitário do Oeste do Paraná – HUOP, de ambos os gêneros, com idade variada, provenientes de diferentes enfermarias, para avaliar se há diferença significativa entre os resultados de eletrólitos sódio, potássio e cloretos, obtidos por um analisador de gases sanguíneos/eletrólitos integrados pelo método ISE direto, a partir de soro e sangue total, ambas amostras arteriais.

Para o estudo retrospectivo, foi feita uma pesquisa dos resultados destes eletrólitos, determinados por um analisador de gases sanguíneos/eletrólitos integrados, pelo método ISE direto, armazenados em banco de dados do Laboratório de Análises Clínicas do HUOP.

Por meio de requerimento médico específico, em atenção à necessidade diagnóstica e de tratamento do paciente, foram coletadas amostras para análise no equipamento Cobas B 121® (Roche).

Para obtenção de sangue total arterial, as amostras foram coletadas com seringas eletrólito-balanceadas, contendo anticoagulante heparina lítica (PICO 50®, Radiometer®). Estas amostras foram analisadas dentro de um período de 30 minutos, após a punção arterial, no equipamento de gases sanguíneos/eletrólitos integrados, para se evitar a interferência no resultado, devido ao armazenamento e/ou processamento inadequados.

Para obtenção de amostras de soro arterial, as mesmas foram coletadas por meio de sistema de coleta a vácuo, com emprego de tubos de plástico, contendo ativador de coágulo, gel separador e agulhas (BD Vacutainer®, Becton Dickinson®). Estas amostras foram obtidas após formação e retração do coágulo sanguíneo, seguida de centrifugação imediata, a 3200 rpm, por 5 minutos, para também se evitarem interferências por armazenamento e processamento inadequados.

Os responsáveis pela coleta e manuseio das amostras de soro e de sangue total arterial foram instruídos quanto às possíveis interferências pré-analíticas decorrentes de procedimentos inadequados durante a coleta e transporte de amostras.

Neste estudo, não foram considerados como critério de exclusão amostras com concentrações alteradas de

lipídios e proteínas sanguíneas.

Ambas as amostras sanguíneas foram prontamente analisadas e os resultados comparados.

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, protocolo número 476/2010.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa R Development Core Team, 2009. Os resultados foram apresentados como média \pm SD e coeficiente de variação, com um $p \leq 0,05$, indicando significância estatística. Como os dados relativos a cada variável são independentes, isto é, sem simetria, foram utilizados testes não paramétricos, como o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Lilliefors. Considerou-se nestes testes o *p-valor* para aceitar ou rejeitar a hipótese nula de que os dados têm distribuição gaussiana. Para a comparação entre os resultados das amostras de soro e sangue total arterial, obtidos por meio do emprego da tecnologia ISE direto, foi utilizado o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico).

RESULTADOS

Os dados relativos a cada variável não apresentaram distribuição gaussiana (Teste de Shapiro-Wilk, e Teste de Lilliefors), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Estatística da distribuição de frequência dos dados

	SK	STK	SNA	STNA	SCL	STCL
Média	4,32	4,11	138,6	137,38	103,82	102,79
S.D	0,76	0,74	7,75	7,35	5,53	5,2
C.V(%)	17,64	18,04	5,59	5,35	5,33	5,06
S-W	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
K-S	<0,001	<0,001	0,024	0,001	0,015	0,015
Skewness	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,006	0,006
Mínimo	2,25	2,44	104,2	118,4	90,6	90,6
Máximo	7,5	7,54	186,5	186,6	123,8	122,3

SK: soro arterial potássio (K+); STK: sangue total arterial potássio (K+); SNA: soro arterial sódio (Na+); SGTNA: sangue total arterial sódio (Na+); SCLG: soro arterial cloreto (Cl-); STCL: sangue total arterial cloreto (Cl-). S.D. Desvio padrão; C.V.: Coeficiente de variação; S-W: Teste de Shapiro-Wilk, com a hipótese nula de que os dados têm distribuição gaussiana; K-S: Teste de normalidade de Lilliefors. Skewness: Teste d'Agostino para assimetria, *p valor* para hipótese alternativa de que os dados são assimétricos

Nenhuma transformação foi possível para que os dados se ajustassem ao critério de "normalidade", com o propósito de suportar testes paramétricos. Além disso, nenhuma variável apresentou simetria na distribuição, o que

impediu a aplicação do teste *t*-Student, para comparações de médias.

A partir do *p* valor mostrado na Tabela 2, observa-se que os constituintes sódio e potássio apresentaram um $p < 0,05$, indicando, portanto, que houve diferenças significativas entre as medidas de soro e sangue total arterial utilizando ISE direto (gasômetro).

Tabela 2 - Comparação entre amostras de sangue total e soro arterial utilizando ISE direto (gasômetro)

	SK / STK	SNA / STNA	SCL / STCL
Teste de Wilcoxon	25548	23764	23576
p-value	0,0003402	0,03517	0,05108

SK: soro arterial potássio (K^+); STK: sangue total arterial potássio (K^+); SNA: soro arterial sódio (Na^+); STNA: sangue total arterial sódio (Na^+); SCLG: soro arterial cloreto (Cl^-); STCL: sangue total arterial cloreto (Cl^-).

Estas diferenças podem ser também visualizadas na Tabela 1, que ilustra os resultados estatísticos de cada constituinte nos dois tipos de amostras estudadas. Observa-se que a média dos resultados do potássio sérico arterial foi superior comparada ao sangue total arterial. O mesmo ocorreu com o sódio sérico arterial que apresentou um $p < 0,05$. Por sua vez, o cloreto apresentou um $p > 0,05$, não havendo, assim, diferença estatisticamente significativa entre os resultados derivados de ambas as matrizes amostrais.

DISCUSSÃO

Para a determinação de sódio, potássio e cloretos com o emprego do método ISE direto, a amostra foi exposta diretamente, sem necessidade de prévia diluição,⁽¹⁰⁾ sendo, em seguida, avaliada a atividade fisiologicamente relevante do íon de interesse, não havendo influência da concentração de sólidos, como lipídios e proteínas.⁽⁸⁾

O método ISE direto fornece uma estimativa mais acurada de sódio, potássio e cloretos e, portanto, deve ser empregado, preferencialmente, para tomadas de decisão clínica.⁽¹⁰⁾

Para qualquer metodologia existe a possibilidade da ocorrência de interferentes e, assim, levar à obtenção de resultados falsos ou inadequados. Entre as fontes de interferência, uma de importância determinante é o tipo de amostra (soro, sangue total, plasma, urina e outros líquidos biológicos).⁽⁸⁾

Neste trabalho, analisaram-se os dados de sódio, potássio e cloretos obtidos pelo uso de um analisador de gases sanguíneos/eletrólitos integrados, marca Cobas®, modelo B 121® (método ISE direto), a partir de dois tipos de amostras, sangue total arterial e soro arterial.

Empregando-se ferramentas estatísticas, diferenças significativas foram encontradas entre os resultados de sódio e potássio, porém, para o constituinte cloreto, não houve

diferenças significativas entre os resultados obtidos com os dois tipos de amostras aqui avaliadas.

Os dados demonstraram valores mais elevados de potássio no soro arterial, quando comparado com o sangue total arterial ($p < 0,05$). Isso pode ocorrer pela presença de hemólise. Essa interferência é uma das causas mais comuns de resultados falsamente elevados de potássio.⁽²⁾ Uma maior probabilidade de se obterem amostras hemolisadas ocorre quando a amostra é centrifugada antes da coagulação ser concluída, o que pode levar a valores elevados de potássio sérico. No entanto, amostras aparentemente hemolisadas não foram analisadas, no presente trabalho, pois a hemólise causaria hipercalemia fictícia linearmente dependente da concentração final de células sanguíneas lisadas.⁽¹¹⁾

Ocasionalmente, contudo, valores falsamente elevados de potássio podem ser encontrados na presença de leucócitos frágeis, em geral, vistos em leucemias linfocíticas crônicas. Estas células frágeis, quando presentes em altas concentrações, rompem-se com o menor impacto mecânico, como na centrifugação, o que poderia levar também a falsos aumentos nos resultados de potássio.^(1,12,13)

Outros estudos relataram, ainda, que um retardo de cerca de 45 minutos na separação das células sanguíneas, mantidas em temperatura ambiente, de pacientes com leucemia pró-linfocítica das células T, pode ocasionar uma extrusão de potássio das células para o soro, acarretando, portanto, a ocorrência de um falso aumento desse constituinte.⁽¹⁾ Resultados falsamente elevados também foram observados em amostras séricas de pacientes com trombocitose, mantidas nas mesmas condições pré-analíticas.^(8,14)

Além dos interferentes mencionados, à medida que a atividade celular diminui, altera-se a captação ativa de potássio pelas células sanguíneas, e a bomba de Na^+ , K^+ -ATPase torna-se inefetiva, não conseguindo manter o balanço eletrolítico. Assim, o potássio é liberado das células para o exterior, causando também um falso aumento.⁽⁸⁾

Quando forem encontrados resultados de potássio superiores a 5,4 mmol/L, recomenda-se que as determinações sejam repetidas, utilizando-se heparina lítica, e a contagem de plaquetas seja averiguada.⁽¹⁵⁾

O segundo constituinte estudado foi o sódio que, assim como o potássio, apresentou a média dos resultados no soro arterial superior à do sangue total arterial.

Estudos anteriores encontraram interferências negativas nas determinações de sódio quando foram utilizados tubos capilares com heparina, com 130 a 200 unidades/mL, em diversos analisadores. No entanto, estes mesmos autores não observaram interferências nos valores de sódio, quando utilizaram tubos capilares eletrólito-balanceados com doses menores de heparina (50 unidades/mL).^(16,17) Foi observada também redução nos resultados de sódio, em análises realizadas em equipamento Ektachem 750

(Ortho-Clinical Diagnostics®, Rochester, NY, E.U.A.), que emprega, igualmente, a metodologia de ISE direto, quando as amostras apresentavam elevadas concentrações de heparina pela utilização, na coleta, de cateter de diálise.^(18,19)

Os dados encontrados nesta pesquisa indicaram existir diferenças significativas entre os resultados de sódio de amostras de soro e de sangue total arterial, mesmo com o emprego de seringas eletrólitos-balanceadas. Como possível causa desse menor valor de sódio, no sangue total arterial obtido com tubos eletrólitos-balanceados, seria a coleta de volume inadequado de amostra sanguínea, principalmente em amostras pediátricas, o que levaria a um excesso de heparina, determinando, assim, a obtenção de resultados diminuídos de sódio.^(8,20)

Por fim, o terceiro constituinte analisado foi o cloreto, o qual não apresentou diferenças significativas entre os dois tipos de matriz. O cloreto é estimado pela equação de Nikolski-Eisenman, já que não há um ionóforo perfeitamente específico para cloretos.⁽²¹⁾ Compostos como brometo, iodeto, tiocianato, salicilato, bicarbonato e a heparina podem interferir nessa determinação, porém, apenas o bicarbonato é geralmente considerado um importante interferente.⁽²¹⁾

Os dados reportados neste estudo concordam com a literatura e sugerem que a heparina empregada para coleta de amostra sanguínea não interferiu de forma significativa nos resultados de cloretos pelo sistema ISE direto.

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostraram que há diferenças entre os valores de sódio e potássio obtidos a partir de diferentes tipos de amostra e estas podem ser devidas a variáveis pré-analíticas inerentes à forma de obtenção destas amostras.

Estudos comparativos com diferentes tipos de amostra ou formas de processamento de amostras são altamente desejáveis, principalmente quando possíveis interferentes podem vir a comprometer os resultados, gerando interpretações errôneas pelo médico e acarretando prejuízos ao paciente.

Abstract

The direct ion-selective electrode (ISE) technology determines the concentration of electrolytes in the plasma component of whole blood or other types of undiluted samples. This study aimed to determine the occurrence of significant differences between the results of sodium, potassium and chloride obtained by a blood gas analyzer/electrolyte integrated, direct ISE method, from arterial serum and whole blood samples. This was a retrospective, prospective, and quantitative study, made by means of a search of data printed and stored in a database of the Laboratory of Clinical Analysis of the University Hospital of the West of Paraná (HUOP). In this study, were included 206 samples of patients admitted to the HUOP, in different sectors, of both genders and varied ages. All the results were compared using the Wilcoxon Test, with a $p \leq 0,05$ indicating statistical significance. There was a significant difference

between the values of the potassium ($p=0,0003$) and sodium ($p=0,035$) obtained from arterial serum and whole blood samples by direct ISE method. However, there was no significant difference between the values of chloride obtained from this two kind of samples.

Keywords

Ion-selective electrode; Electrolyte; Direct ISE

REFERÊNCIAS

- Dimeski G, Bird R. Hyperleukocytosis: pseudohyperkalemia and other biochemical abnormalities in hyperleukocytosis. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(7):880-1.
- Fincher RK, Strong JS, Jackson JL. Accuracy of measurements of hemoglobin and potassium in blood samples from peripheral catheters. *Am J Crit Care.* 1998;7(6):439-43
- Évora PRB, Reis CL, Ferez MA, Conte DA, Garcia LV. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido-básico - uma revisão prática. *Med. Ribeirão Preto.* 1999; 32:451-69.
- Barbosa AP, Sztajnbok J. Distúrbios hidroeletrólíticos. *J Ped.* 1999;75(Supl.2):s223-s33
- Li X1, Wang X, Zhang L, Lee S, Dai H. Chemically derived, ultrasmooth graphene nanoribbon semiconductors. *Science.* 2008;319(5867):1229-32.
- Frant MS, Ross Jr, W, Riseman JH. Electrode indicator technique for measuring low levels of cyanide. *Anal Chem.* 1972;44(13): 2227-30.
- Panteghini M, Bonora R, Malchiodi A, Calarco M. Evaluation of the direct potentiometric method for serum chloride determination--comparison with the most commonly employed methodologies. *Clin Biochem.* 1986;19(1):20-5.
- Dimeski G, Badrick T, John AS. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences--a review. *Clin Chim Acta.* 2010;411(5-6):309-17.
- Dimeski G, Barnett RJ. Effects of total plasma protein concentration on plasma sodium, potassium and chloride measurements by an indirect ion selective electrode measuring system. *Crit Care Resusc.* 2005;7(1):12-5.
- Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, Külpmann WR, Lewenstam A, Maas AH, et al. Recommendations for measurement of and conventions for reporting sodium and potassium by ion-selective electrodes in undiluted serum, plasma or whole blood. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). IFCC Scientific Division Working Group on Selective Electrodes. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38 (10):1065-71.
- Brescia VMD, Tampoia MMD, Mileti AMD. Evaluation of Factitious Hyperkalemia in Hemolytic Samples: Impact of the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration. *Lab. Med.* 2009;40(4): 224-226
- Colussi G, Cipriani D. Pseudohyperkalemia in extreme leukocytosis. *Am J Nephrol.* 1995;15(5):450-2.
- Kellerman PS, Thornbery JM. Pseudohyperkalemia due to pneumatic tube transport in a leukemic patient. *Am J Kidney Dis.* 2005;46 (4):746-8.
- Fogh-Andersen N, Wimberley PD, Thode J, Siggaard-Andersen O. Determination of sodium and potassium with ion-selective electrodes. *Clin Chem.* 1984;30(3):433-6.
- Thurlow V, Ozevlat H, Jones SA, Bailey IR. Establishing a practical blood platelet threshold to avoid reporting spurious potassium results due to thrombocytosis. *Ann Clin Biochem.* 2005;42(Pt 3): 196-9.
- Vuillaume I, Penet S, Rakza T, Storme L, Kacet N, Lequien P, et al. High concentrations of lithium heparin decrease measured serum sodium in some analyzers. *Clin Chem.* 1999;45(10): 1880-1.

17. Zoppi F, Guagnellini E, Manzoni A. Incomplete recovery of sodium determined in direct potentiometry in blood samples added with heparin salts. *Scand J Clin Lab Invest.* 1993;53(5):529-37.
18. Jacobs E, Ancy JJ, Smith M. Multi site performance evaluation of pH, blood gas, electrolyte, glucose and lactate determinations with the GEM Premier 3000 critical care analyzer. *Point of Care.* 2002; 1:135-144.
19. Karon BS, Kempe KC, Scott MG. Heparin interference with sodium and albumin assays. *Clin Chem.* 1997;43(4):697-8.
20. Yip PM, Chan MK, Zielinski N, Adeli K. Heparin interference in whole blood sodium measurements in pediatric setting. *Clin Biochem.* 2006;39(4):391-5.
21. Rayana MC, Burnett RW, Covington AK, D'Orazio P, Fogh-Andersen N, Jacobs E, et al; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Recommendation for measuring and reporting chloride by ISEs in undiluted serum, plasma or blood. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):346-52.

Correspondência

Paulino Yassuda Filho

Laboratório de Bioquímica Clínica

Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP)

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Av. Tancredo Neves, 3224 - Bairro Santo Onofre

85806-470 – Cascavel - PR

Tel.: (45) 3321-5403.

yassudafilho@yahoo.com.br.

Perfil lipídico de transplantados renais em uso de terapia imunossupressora

Lipid profile in post renal transplant patients treated with immunosuppressive therapy

Marialva Almeida Gonçalves¹

Adroaldo Lunardelli²

Sheila Bünecker Lecke³

Carine Ghem⁴

Jarbas Rodrigues de Oliveira⁵

Resumo

Objetivo: A prevalência de alterações no perfil lipídico de transplantados renais é muito alta, sendo a doença cardiovascular uma das principais causas de mortalidade nesses pacientes. Mesmo após o transplante renal, as complicações cardíacas não diminuem. O objetivo foi avaliar o perfil lipídico de pacientes transplantados renais em uso de terapia imunossupressora e relacionar qual dos imunossupressores estaria associado a alterações no perfil lipídico. **Métodos:** Estudo retrospectivo realizado com 186 pacientes em terapia imunossupressora pós-transplante renal com ciclosporina, tacrolimus ou sirolimus. Foram coletadas amostras dos pacientes que realizaram transplante renal entre 2002 e 2007, na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, e que foram incluídos na pesquisa. **Resultados:** Foi observado que os níveis de colesterol aumentaram nos pacientes em uso de ciclosporina e sirolimus, independentemente do tempo de tratamento. A análise da concentração sérica dos triglicerídeos mostrou diminuição, após 24 meses, no grupo que fazia uso de sirolimus. O HDL-C mostrou-se mais elevado em todos os grupos, independente do tempo, após o transplante renal. Quanto ao LDL-C, verificou-se diminuição com o passar do tempo de tratamento no grupo que fazia uso de ciclosporina. A razão colesterol total/HDL-C diminuiu com o tratamento de ciclosporina e de tacrolimus após 24 meses. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o tacrolimus e a ciclosporina são os imunossupressores menos prejudiciais ao perfil lipídico dos pacientes transplantados renais, no entanto, o sirolimus está associado à maior alteração no perfil lipídico, podendo levar os pacientes a um pior prognóstico cardíaco.

Palavras-chave

Ciclosporina; Sirolimo; Tacrolimo; Imunossupressores

INTRODUÇÃO

O uso dos imunossupressores ciclosporina (CSA), tacrolimus (TACR) e sirolimus (SIRO), em transplantados renais (TxR), tem sido fortemente associado à dislipoproteinemia pós-transplante.^(1,2) Os inibidores da calcineurina, como CSA e o TACR, baseados no sítio de ação imunorregulatório, são supressores da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T; já o SIRO, que não apresenta efeito sobre a atividade da calcineurina, inibe a ativação e proliferação do linfócito T, inibindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.⁽³⁾

A CSA é sintetizada pelo fungo *Tolypocladium inflatum gans* e age bloqueando a enzima 25-hidroxilase no metabolismo de síntese dos ácidos biliares, circula associada às lipoproteínas, sendo metabolizada via citocromo P450.⁽²⁾

Embora seja um imunossupressor amplamente utilizado, provoca nefrotoxicidade e aumento dos fatores de risco cardiovascular, por aumentar os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e promover aumento dos níveis de triglicerídeos circulantes, através da inibição da lipase lipoproteica. Esta droga constitui o imunossupressor mais relacionado ao ganho de peso, à elevação da pressão arterial sanguínea e de lipídeos circulantes.^(4,5)

O TACR é um antibiótico macrolídeo sintetizado por *Streptomyces tsukubaensis*, metabolizado pelo citocromo P450, subfamília 3A.⁽⁶⁾ Em relação à toxicidade é semelhante à CSA, entretanto, exerce menos efeito sobre o perfil lipídico, e estudos recentes demonstram que esse imunossupressor relaciona-se ao aumento do risco para o aparecimento de *diabetes mellitus*.^(1,4) Alguns dados sugerem que o uso de TACR está associado à redução significativa do nível sérico

¹Bioquímica do Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.

²Bioquímico da Hemoterapia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Bioquímico) – Porto Alegre, RS.

³Professora da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.

⁴Doutoranda pela Fundação Universitária de Cardiologia – Porto Alegre, RS.

⁵Professor titular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS.

de colesterol total, em comparação com CSA.⁽⁶⁻⁸⁾ As diferenças clínicas e metabólicas entre a CSA e o TACR ainda não foram totalmente compreendidas, mas observa-se maior desenvolvimento de hipertensão, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia na terapia com CSA, em comparação ao tratamento com TACR.^(9,10)

O SIRO é um potente imunossupressor, estruturalmente semelhante ao TACR e vem sendo utilizado amplamente, pois tem sido mais efetivo que a terapia convencional, em reduzir a ocorrência e a severidade de rejeição do órgão transplantado. É sintetizado pelo actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* e seus principais efeitos colaterais são hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia associada a trombocitopenia.^(6,7) Estudos demonstram que essa droga aumenta os fatores de risco para hiperlipidemia pós-transplante e aumenta o risco cardíaco, sendo tão prejudicial quanto a CSA para pacientes TxR.^(1,4,8,9)

A aterosclerose é uma causa frequente de morbidade e mortalidade em pacientes com doença renal crônica (DRC), principalmente quando chegam ao estado terminal da doença.⁽⁴⁾ A dislipidemia, um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares em pacientes com DRC, tem sido de difícil definição e, infelizmente, as alterações no perfil lipídico e complicações cardíacas continuam mesmo depois do TxR.^(10,11)

As anormalidades lipídicas mais comuns observadas durante a pré-diálise dos pacientes candidatos ao TxR incluem aumento dos triglicerídeos, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), aumento da concentração de lipoproteína A e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-C). Assim como o acúmulo de lipídeos oxidados, os níveis séricos de colesterol total e LDL-C encontram-se normais ou ligeiramente reduzidos nesses pacientes, mesmo após o TxR.^(1,9)

A prevalência de dislipidemia em todos os estágios da doença renal é muito alta e tem sido associada, também, com a rejeição tardia do enxerto.^(11,12) Estudos mostram que todas as frações lipídicas aumentam entre o pré-transplante e até um ano após o procedimento cirúrgico e descrevem que a capacidade antioxidante se encontra reduzida nos receptores de um transplantado renal, sugerindo que as modificações das lipoproteínas pela oxidação é um fenômeno chave para indução precoce da aterosclerose pós-transplante.^(13,14)

Observa-se a coexistência de vários fatores de risco cardíaco entre os pacientes pós-transplantados renais, sendo que um dos mais importantes é o uso de imunossupressores.⁽¹¹⁾

Assim sendo, torna-se adequado o desenvolvimento desse estudo, que objetiva avaliar o perfil lipídico de pacientes transplantados renais em uso de terapia imunossupressora com ciclosporina, tacrolimus ou sirolimus, bem como verificar qual dos imunossupressores estaria associado a uma maior alteração no perfil lipídico desses pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi realizado com 186 pacientes (112 homens e 74 mulheres), com idade entre 18 e 65 anos, em terapia imunossupressora pós-transplante renal com CSA, TACR ou SIRO. Os resultados referentes ao perfil lipídico – colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicerídeos – foram coletados a partir do banco de dados de todos os pacientes que realizaram transplante renal, entre janeiro de 2002 e dezembro de 2007, na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). Foram excluídos os pacientes que realizaram outro transplante além do renal, bem como aqueles que utilizaram, concomitantemente, mais de uma terapia imunossupressora. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da ISCMPA sob o número 3567/11.

O estudo foi dividido em três grupos de pacientes com DRC: 1) pacientes em uso de CSA (61 pacientes), 2) pacientes em uso de TACR (63 pacientes), e 3) pacientes em uso de SIRO (62 pacientes). O perfil lipídico foi avaliado antes (controle), 6, 12 e 24 meses após o TxR.

A quantificação sérica de colesterol total, HDL-C e triglicerídeos foi realizada no Laboratório Central de Análises Clínicas da ISCMPA, por colorimetria, no equipamento Advia 1800 (Siemens). O LDL-C foi calculado a partir da fórmula de Friedewald para amostras com níveis de triglicerídeos séricos inferiores a 400 mg/dL. Esta fórmula não tem linearidade para valores superiores a 400 mg/dL, portanto, nesses casos, o LDL-C não foi calculado. A razão colesterol total/HDL-C foi calculado realizando-se uma divisão entre esses dois parâmetros.⁽¹⁵⁾

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram descritos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações múltiplas entre grupos foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste complementar LSD (*Least Significant Difference test*). Consideramos as diferenças como estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O programa Statistical Package for Social Sciences 18 (SPSS, Chicago, IL, EUA) foi empregado nas análises.

RESULTADOS

As Figuras 1-5 apresentam os dados de perfil lipídico (respectivamente, colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, LDL-C e razão colesterol total/HDL-C) dos pacientes transplantados renais estratificados de acordo com a terapia imunossupressora, em momentos distintos, após o início do tratamento (6, 12 e 24 meses). Pode-se observar que, após 6, 12 e 24 meses de tratamento, os pacientes em uso de CSA apresentaram níveis significativamente mais elevados de colesterol total em relação ao seu grupo controle (Cc), mas com diminuição de seus níveis ao longo do tempo estudado ($231,6 \pm 6,5$ vs. $186,5 \pm 6,0$; $217,0 \pm 6,6$ vs. $186,5 \pm 6,0$;

204,3 ± 6,0 vs. 186,5 ± 6,0 mg/dL, respectivamente) (Figura 1). Observa-se que os pacientes em uso de CSA, após seis meses de tratamento, possuem níveis de colesterol total mais elevados do que os pacientes em uso de CSA, por 24 meses, e essa diferença foi significativa (231,6 ± 6,5 vs. 204,3 ± 6,0). Após 6 meses de tratamento com SIRO, os pacientes apresentaram níveis significativamente mais elevados de colesterol total em relação ao seu grupo controle (Cs) (216,8 ± 6,3 vs. 188,4 ± 6,0 mg/dL).

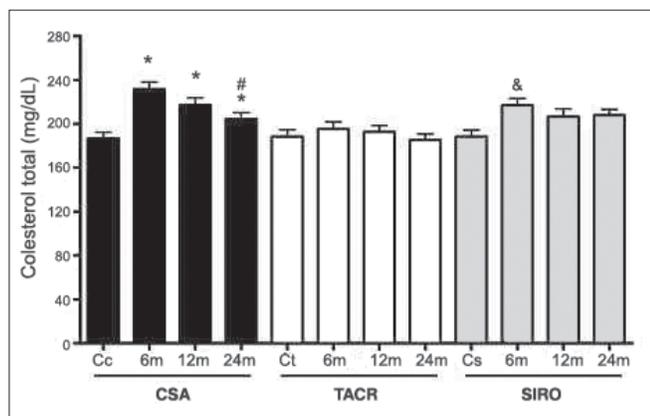


Figura 1. Níveis séricos de colesterol total dos grupos de transplante renal tratados com diferentes imunossupressores (CSA, ciclosporina; TACR, tacrolimus; SIRO, sirolimus) analisados antes (C), após seis meses (6m), doze meses (12m) e vinte e quatro meses (24m) após o transplante. Dados expressos em média ± EPM, considerando $p < 0,05$ por teste de LSD: * vs. Cc, # vs. CSA 6m, & vs. Cs

A análise da concentração sérica dos triglicerídeos entre os diferentes grupos de pacientes mostrou que este parâmetro sofreu diminuição somente entre o grupo após 24 meses de tratamento com SIRO e o seu grupo controle (Cs) (154,3 ± 8,98 vs. 168,6 ± 10,46 mg/dL). A Figura 2 mostra a concentração sérica dos triglicérides nos diferentes grupos analisados.

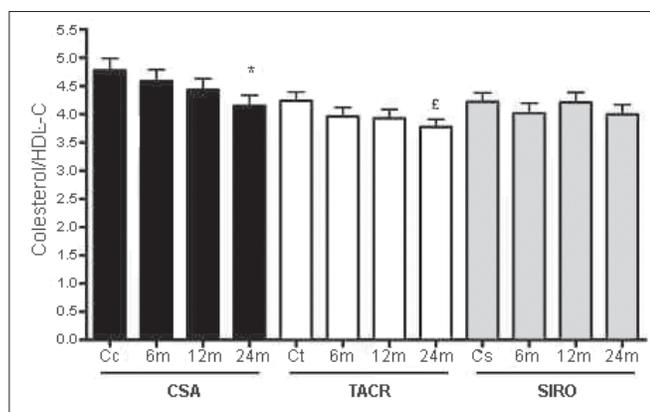


Figura 2. Níveis séricos de triglicerídeos dos grupos de transplante renal tratados com diferentes imunossupressores (CSA, ciclosporina; TACR, tacrolimus; SIRO, sirolimus) analisados antes (C), após seis meses (6m), doze meses (12m) e vinte e quatro meses (24m) após o transplante. Dados expressos em média ± EPM, considerando $p < 0,05$ por teste de LSD: + vs. SIRO 6m.

Conforme mostra a Figura 3, o HDL-C, quando foram analisados os pacientes que utilizavam a CSA pôde-se observar que, após 6, 12 e 24 meses de tratamento, houve diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o grupo controle (Cc) (53,71 ± 1,9 vs. 41,0 ± 1,4; 52,36 ± 1,7 vs. 41,0 ± 1,4; 51,65 ± 1,8 vs. 41,0 ± 1,4 mg/dL, respectivamente), assim como entre o grupo TACR, após 6 e 12 meses de tratamento, e o grupo controle (Ct) (52,2 ± 2,0 vs. 46,7 ± 1,7; 52,1 ± 2,1 vs. 46,7 ± 1,7 mg/dL, respectivamente). Para os pacientes em uso de SIRO, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes, após 6 e 24 meses de tratamento quando comparados com o grupo controle (Cs) (57,7 ± 1,7 vs. 46,8 ± 1,5; 53,9 ± 1,7 vs. 46,8 ± 1,5 mg/dL), bem como entre os grupos, após 6 e 12 meses de uso de SIRO, quando comparados entre si (57,7 ± 1,7 vs. 50,8 ± 1,6 mg/dL).

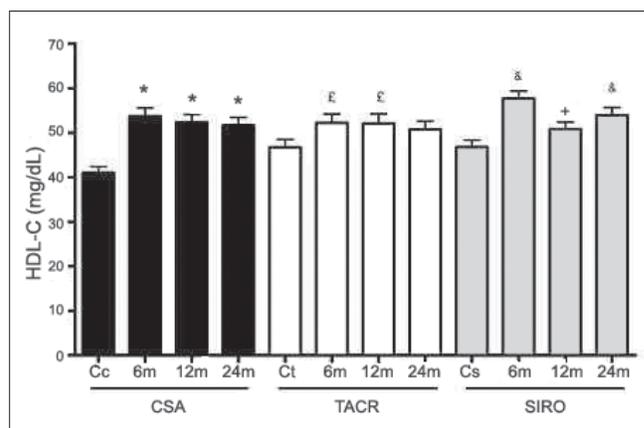


Figura 3. Níveis séricos de HDL-C dos grupos de transplante renal tratados com diferentes imunossupressores (CSA, ciclosporina; TACR, tacrolimus; SIRO, sirolimus) analisados antes (C), após seis meses (6m), doze meses (12m) e vinte e quatro meses (24m) após o transplante. Dados expressos em média ± EPM, considerando $p < 0,05$ por teste de LSD: * vs. Cc, £ vs. Ct, & vs. Cs, + vs. SIRO 6m.

Ao analisarmos o parâmetro LDL-C, pode-se verificar que houve diferença estatística entre o grupo controle (Cc) e os grupos após 6 e 12 meses de tratamento com CSA (139,2 ± 5,9 vs. 107,9 ± 4,8; 129,0 ± 5,7 vs. 107,9 ± 4,8 mg/dL, respectivamente), como também entre os grupos após 6 e 24 meses de tratamento com CSA quando comparados entre si (139,2 ± 5,9 vs. 119,1 ± 5,7 mg/dL). A Figura 4 demonstra o comportamento do LDL-C nos grupos em estudo.

Analisando a razão entre o colesterol total/HDL-C (Figura 5), pode-se perceber que houve diferença estatística entre o grupo que utilizava CSA, após 24 meses de tratamento, e seu grupo controle (Cc) (4,14 ± 0,19 vs. 4,78 ± 0,21), como também entre o grupo em uso de TACR, após 24 meses de tratamento, e seu grupo controle (Ct) (3,77 ± 0,14 vs. 4,24 ± 0,16). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos que utilizavam SIRO.

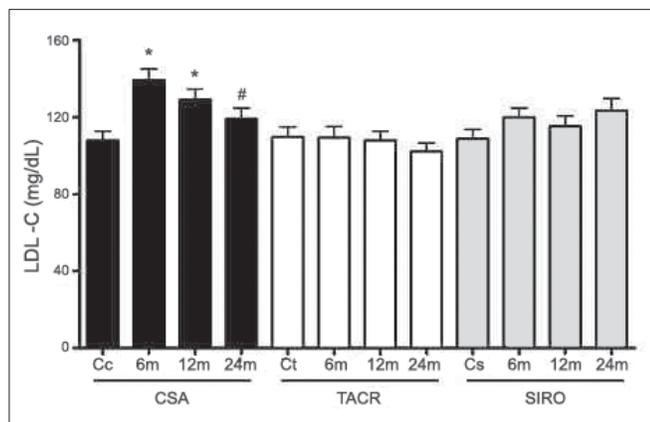


Figura 4. Níveis séricos de LDL-C dos grupos de transplante renal tratados com diferentes imunossupressores (CSA, ciclosporina; TACR, tacrolimus; SIRO, sirolimus) analisados antes (C), após seis meses (6m), doze meses (12m) e vinte e quatro meses (24m) após o transplante. Dados expressos em média \pm EPM, considerando $p < 0,05$ por teste de LSD: * vs. Cc, # vs. CSA 6m.

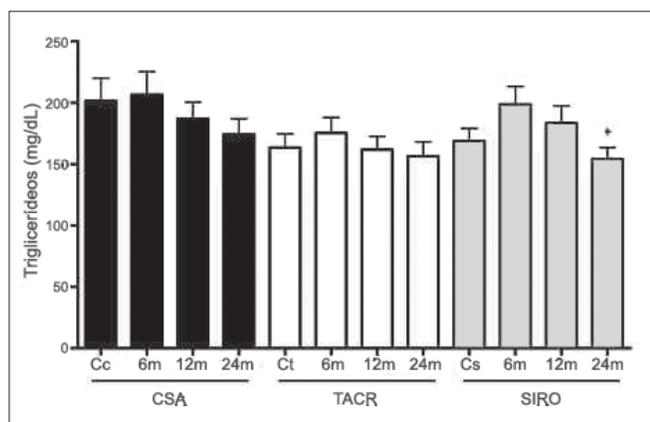


Figura 5. Relação colesterol total/HDL-C dos grupos de transplante renal tratados com diferentes imunossupressores (CSA, ciclosporina; TACR, tacrolimus; SIRO, sirolimus) analisados antes (C), após seis meses (6m), doze meses (12m) e vinte e quatro meses (24m) após o transplante. Dados expressos em média \pm EPM, considerando $p < 0,05$ por teste de LSD: * vs. Cc, £ vs. Ct.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o perfil lipídico de pacientes transplantados renais em uso de terapia imunossupressora com ciclosporina, tacrolimus ou sirolimus. O presente estudo demonstrou que, para o colesterol total, houve diferença significativa entre o grupo de pacientes que utilizaram CSA, após 6, 12 e 24 meses, e SIRO, após 6 meses de tratamento, em relação aos seus grupos controles, demonstrando que o uso destes imunossupressores está correlacionado a um pior prognóstico dessa fração lipídica, como relatado na literatura. Pacientes que fizeram uso de TACR mostraram que a concentração de colesterol total não aumentou significativamente nos tempos estudados, corroborando com o fato de que CSA e SIRO promovem um pior prognóstico para

o perfil lipídico quando comparado com o TACR, em relação ao colesterol total.

Desordens lipídicas, como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, são bem mais frequentes em pacientes tratados com CSA do que com TACR, pois a CSA inibe a síntese de ácidos biliares a partir do colesterol e o seu transporte para o intestino, não havendo ligação com os receptores de LDL-C; sendo assim, haverá aumento nos seus níveis e redução da atividade da lipoproteína lipase. Estes efeitos resultarão em diminuição do clearance de VLDL-C e LDL-C.^(6,16) Como a CSA se liga aos receptores do LDL-C, pode ocorrer interferência no controle do *feedback* da síntese de colesterol total, levando à diminuição da degradação do colesterol total devido à redução na síntese de ácido biliar.^(10,17,18) Os valores de colesterol total mostraram-se maiores para os pacientes que usaram CSA, em todo o tempo estudado, quando comparados com o seu grupo controle (Cc), mostrando que essa droga parece ser ainda mais prejudicial para esse parâmetro. Por outro lado, os resultados aqui apresentados demonstraram que houve diminuição dos níveis de colesterol total quando analisaram-se esses pacientes, ao longo do tempo estudado, demonstrando uma adaptação dos pacientes após 24 meses de tratamento. Para os demais imunossupressores, também foi possível observar uma leve diminuição ou estabilização desse parâmetro, embora não tenha sido significativo. Estudos mostram que o aumento nos níveis de colesterol total e triglicerídeos foram observados em apenas trinta dias, após o TxR, atingindo valores máximos, após 6 meses, e tendendo à estabilização, ao final do primeiro ano, independentemente do imunossupressor utilizado.⁽⁴⁾ Embora cada imunossupressor atue diferentemente sobre o perfil lipídico dos pacientes transplantados, todos os pacientes em uso de CSA e TACR demonstraram diminuição nos níveis de colesterol total ao longo do tempo estudado, chegando em 24 meses, após o TxR, quase a níveis séricos normais, o que não foi percebido nos pacientes que utilizaram SIRO, pois esses, após 24 meses de tratamento, apresentaram valores de colesterol total semelhantes aos dos pacientes que estavam utilizando esse imunossupressor por 12 meses.⁽¹³⁾

Para os triglicerídeos, houve diferença para os pacientes que usavam SIRO entre os grupos, após 6 e 24 meses de tratamento. Os resultados sugerem, novamente, uma adaptação dos pacientes à droga imunossupressora, quando comparados aos seus controles, pois os valores encontrados foram decrescendo, ao passar do tempo, para os três imunossupressores estudados. A maioria dos estudos apresentados relata o aumento nos triglicerídeos como um efeito adverso dos imunossupressores, mas um estudo de Spinelli et al.⁽¹⁶⁾ relata que o manejo das concentrações administradas aos pacientes, destas drogas, também estão associadas a reduções paralelas nos níveis de colesterol total e triglicerídeos, pois há uma correlação entre a redução das dosagens dos imunossupressores e o uso

de estatinas com diminuição nos níveis séricos desses dois parâmetros. Já entre os grupos SIRO 6 e 24 meses, quando comparados entre si, houve uma diferença significativa com diminuição importante dos níveis de triglicerídeos, demonstrando, mais uma vez, um efeito benéfico da decorrência do tempo do TxR.

Quando foi analisado o HDL-C, pôde-se concluir que todos os grupos estudados apresentaram valores aumentados quando comparados ao grupo controle. O papel antiaterogênico do HDL-C tem implicações importantes para o controle das doenças cardíacas.⁽¹⁹⁾ Os pacientes mostraram aumento nos níveis de HDL-C, sendo mais acentuado nos que usaram SIRO após 6 meses do TxR. Este bom prognóstico apareceu em todas as drogas imunossupressoras estudadas, como relatado em um estudo de Spinelli et al.⁽⁴⁾ Foram encontradas, neste estudo, diferenças significativas em todas as drogas, em diferentes tempos, após o TxR, quando comparadas com o seu grupo controle, sendo as mais expressivas entre o grupo Cc e os grupos CSA 6, 12 e 24 meses e o grupo Cs e o grupo SIRO 6 meses, demonstrando que essas drogas exerceram maior influência sobre esse parâmetro, já que os níveis séricos de HDL-C se mostraram maiores.⁽⁷⁻⁹⁾

Os pacientes dos grupos em tratamento de 6 e 12 meses com CSA apresentaram níveis séricos de LDL-C maiores quando comparados com o grupo controle (Cc), demonstrando mais uma vez a interferência que essa droga exerce sobre o perfil lipídico dos pacientes transplantados. Essas diferenças encontradas corroboram com a literatura pesquisada.^(1,3,4) Em relação à CSA, nota-se que os níveis de LDL-C tendem a diminuir com o passar do tempo, exibindo uma possível adaptação dos pacientes, já relatada em outros parâmetros anteriormente. No caso do SIRO, os pacientes analisados não demonstraram o pior prognóstico, o que vai contra a ideia de que o SIRO é o imunossupressor mais prejudicial ao perfil lipídico dos pacientes transplantados, pois, segundo a literatura, o sirolimus altera a via de sinalização da insulina, aumentando a atividade da lipase tecidual adiposa e/ou diminuindo a atividade da lipase lipoproteica, o que resulta em um aumento da síntese hepática de triglicerídeos, LDL-C e VLDL-C.^(2,16,19,20) De acordo com o presente estudo, os pacientes que apresentaram os piores níveis de LDL-C, em relação ao seu controle, foram os que estavam em uso de CSA, mostrando, mais uma vez, o prejuízo causado por essa droga ao perfil lipídico;⁽⁴⁾ por outro lado, ficou evidente que há diminuição dos níveis séricos de LDL-C, ao longo do tempo estudado, demonstrando, novamente, benefícios ao longo do tempo de uso da droga. Por sua vez, o TACR foi o que se mostrou menos prejudicial para os pacientes TxR, em relação ao LDL-C, pois foi o que apresentou menor alteração para esse parâmetro. Embora essa diferença não tenha sido significativa, reforça a ideia de que o TACR é o imunossupressor que menos prejuízos traz aos lipídeos dos pacientes transplantados renais. Os maiores níveis séricos de LDL-C foram observados nos pacientes em uso de CSA e

os menores, nos pacientes em uso de TACR, quando comparamos com os seus respectivos controles.

A razão colesterol total/HDL-C é um dado utilizado para a determinação de fatores de risco para doenças cardíacas. Quanto maior for o resultado dessa divisão, maior o risco de se desenvolver doença cardiovascular (DCV).⁽¹⁵⁾ Quando analisada a razão entre o colesterol total/HDL-C, pôde-se perceber que houve diferença estatística entre o grupo dos pacientes que utilizaram CSA, após 24 meses, e o seu grupo controle (Cc), bem como entre o grupo após 24 meses de uso de TACR e o seu grupo controle (Ct). Pôde-se entender que há diminuição nos fatores de risco para DCV nos pacientes que utilizaram CSA e TACR, por 24 meses, o que vai de encontro com a literatura.^(7,8,10)

Muitos estudos comprovam que, após o transplante, há aumento de todas as frações lipídicas, sendo que um estudo de Spinelli et al.⁽¹⁶⁾ mostrou que um ano após esse procedimento cirúrgico a proporção de doentes com perfil lipídico normal foi reduzido para 10%. Imunossupressores como a CSA e SIRO desempenham papel importante na hiperlipidemia pós-transplante e são potenciais causas remediáveis em pacientes renais crônicos, após o TxR.^(1,7,11) Sabe-se que uma das maiores causas de morte de pacientes TxR são as complicações cardíacas e que estas, geralmente, estão associadas à alteração dos lipídeos sanguíneos que colaboram com outros fatores para a formação de aterosclerose. Esclarecimentos sobre o efeito que cada imunossupressor causa aos pacientes proporciona maiores subsídios para que se escolha a terapia imunossupressora que mais beneficie o paciente, com menores efeitos adversos, melhor qualidade e perspectiva de vida pós-transplante.^(5,8,22,23)

Há relatos que, após o TxR, há aumento da atividade de duas enzimas que envolvem o clearance de lipoproteínas (lipase hepática e lipoproteína lipase) e que isso pode estar correlacionado a uma melhora no perfil lipídico dos pacientes após o TxR. Os pacientes contemplados por este estudo mostraram aumento do HDL-C para todos os imunossupressores utilizados e isso pode ser visto como consequência do melhor metabolismo de triglicerídeos. Um estudo de Cassader et al. acompanhou durante seis anos pacientes em uso de CSA e não destacou claramente os efeitos dessa droga sobre o perfil lipídico dos pacientes transplantados e nem permitiu a avaliação de um efeito direto da terapia imunossupressora sobre o metabolismo das lipoproteínas, mostrando como é difícil se chegar a uma conclusão definitiva.⁽²⁴⁾

Este estudo sugere que os imunossupressores CSA e TACR foram menos prejudiciais ao perfil lipídico dos pacientes transplantados renais, mostrando inclusive benefícios, pois foram os que apresentaram diminuição na razão colesterol total/HDL-C, como também aumento nos níveis de HDL-C e tendências à diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-C ao logo dos tempos estudados. O SIRO foi o único que não apresentou diminuição na razão colesterol total/HDL-C, o que nos leva a crer que esse

imunossupressor seja o mais prejudicial ao perfil lipídico dos pacientes TxR, pois pode levar ao pior prognóstico cardíaco.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos os esforços dos colaboradores Dr Carlos Voegeli, Dra Ionara Kohler (Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre) e Dra Elizete, sem os quais este desígnio não seria possível.

Abstract

Objective: The prevalence of abnormal lipid profile in renal transplant patients is very high. Cardiovascular disease is a major cause of mortality in these patients. Even after renal transplantation, cardiac complications do not diminish. The aim was evaluate the lipid profile of kidney transplant patients in use of immunosuppressive therapy with cyclosporine, tacrolimus or sirolimus and to list which of immunosuppressive drug was associated with changes in lipid profile. **Methods:** Retrospective study with 186 patients on immunosuppressive therapy after renal transplantation with cyclosporine, tacrolimus or sirolimus. Samples were collected from all patients who underwent renal transplantation between 2002 and 2007 at the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. **Results:** We found that cholesterol levels increased in patients on cyclosporine and sirolimus regardless of treatment time. Analysis of serum triglycerides showed a decrease after 24 months in the group that was taking sirolimus. The HDL-C was found to be higher in all groups, regardless of the time, after renal transplantation. The LDL-C decreased over treatment time in the group that was on cyclosporin. The ratio of total cholesterol/HDL-C decreased with the treatment of cyclosporine and tacrolimus after 24 months. **Conclusion:** The results suggest that tacrolimus and cyclosporine are the immunosuppressive drugs less harmful to the lipid profile of kidney transplant patients, and that sirolimus is associated with greater alteration in lipid profile and may lead patients to a worst cardiac prognosis.

Keywords

Cyclosporine; Tacrolimus; Sirolimus; Immunosuppressive Agents

REFERÊNCIAS

- Lacquaniti A, Bolignano D, Donato V, Bono C, Fazio MR, Buemi M. Alterations of lipid metabolism in chronic nephropathies: mechanisms, diagnosis and treatment. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33(2):100-10.
- Thervet E. Sirolimus therapy following early cyclosporine withdrawal in transplant patients: mechanisms of action and clinical results. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):269-81.
- Garcia SC, Lopes LS, Schott KL, Beck ST, Pombum VJ. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(6):393-401.
- Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs.* 2009;69(16):2227-43.
- Suleiman B, El Imam M, El Sabigh M, Eltahir K, Eltahir A, Miskeen E. Lipid profile in post renal transplant patients treated with cyclosporine in Sudan. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009;20(2):312-7.
- Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(5):328-35.
- Firpi RJ, Tran TT, Flores P, Nissen N, Colquhoun S, Shackleton C, et al. Sirolimus-induced hyperlipidaemia in liver transplant recipients is not dose-dependent. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19(9):1033-9.
- Trotter JF, Wachs ME, Trouillot TE, Bak T, Kugelmas M, Kam I, et al. Dyslipidemia during sirolimus therapy in liver transplant recipients occurs with concomitant cyclosporine but not tacrolimus. *Liver Transpl.* 2001;7(5):401-8.
- Martínez Castela A, Ramos R, Serón D, Gil-Vernet S, Fiol C, Gómez-Gerique N, et al. Effect of cyclosporin and tacrolimus on lipoprotein oxidation after renal transplantation. *Nefrología.* 2002;22(4):364-9. [Article in Spanish].
- Neal DA, Gimson AE, Gibbs P, Alexander GJ. Beneficial effects of converting liver transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus on blood pressure, serum lipids, and weight. *Liver Transpl.* 2001;7(6):533-9.
- Vaziri ND. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. *Semin Dial.* 2009;22(6):644-51.
- Okubo M, Kobayashi N, Nakamura M, Naito M. Renal disease e abnormal lipid metabolism. *J Rural Med.* 2006;2:13-21.
- Spinelli GA, Felipe CR, Park SI, Mandia-Sampaio EL, Tedesco-Silva H Jr, Medina-Pestana JO. Lipid profile changes during the first year after kidney transplantation: risk factors and influence of the immunosuppressive drug regimen. *Transplant Proc.* 2011;43(10):3730-7.
- Pérez de Hornedo J, de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T. Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells. *Nefrología.* 2007;27(5):565-73. [Article in Spanish].
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Fundamentos de Química Clínica.* 6a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Spinelli GA, Felipe CR, Machado PG, Garcia R, Casarini DE, Moreira SR, et al. ationship of cyclosporin and sirolimus blood concentrations regarding the incidence and severity of hyperlipidemia after kidney transplantation. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(1):19-30.
- Jurewics AW. Tacrolimus versus Cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 1:i7-11.
- Pita-Fernández S, Pértega-Díaz S, Valdés-Cañedo F, Seijo-Bestilleiro R, Seoane-Pillado T, Fernández-Rivera C, et al. Incidence of cardiovascular events after kidney transplantation and cardiovascular risk scores: study protocol. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011;11:2.
- Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2003;39(4):283-8.
- Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: A review. *J Transplant.* 2012;2012:230386.
- Razeghi E, Shafipour M, Ashraf H, Pourmand G. Lipid disturbances before and after renal transplant. *Exp Clin Transplant.* 2011;9(4):230-51.
- Alghamdi S, Nabi Z, Skolnik E, Alkorbi L, Albaqumi M. Cyclosporine versus tacrolimus maintenance therapy in renal transplant. *Exp Clin Transplant.* 2011;9(3):170-4.
- Cassades M, Ruiu G, Gambino R, Alemanno N, Trolo G, Veglia F, et al. Lipoprotein-apolipoprotein changes in renal transplant recipients. *Lipids.* 2002;37(10):967-74.

Correspondência

Jarbas Rodrigues de Oliveira

Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),
Av. Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221
90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil
jarbas@pu.rs.br

Diagrama de Ishikawa e 5W2H como ferramentas de gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas

Ishikawa diagram and 5W2H as quality management tools in clinical analysis laboratory

Franciele Carlesso¹

Rejane Giacomelli Tavares²

Resumo

Introdução: As ferramentas da qualidade são técnicas gerenciais utilizadas para definir, mensurar, analisar e propor soluções de problemas que interferem nas instituições empresariais e comerciais, como, por exemplo, no laboratório de análises clínicas, facilitando a solução e resolução destes, diminuindo os custos para a instituição e assegurando aos clientes a prestação de serviços mais qualificados. **Objetivos:** Analisar a aplicação das ferramentas da qualidade, Diagrama de Ishikawa e 5W2H, para otimização dos processos gerenciais em um laboratório de análises clínicas. **Métodos:** Analisaram-se registros de reclamações de clientes atendidos em um laboratório de análises clínicas da região do Vale dos Sinos, no período de junho a agosto de 2013. Utilizou-se o Diagrama de Ishikawa para a identificação, e a análise das reclamações e o 5W2H para a proposição de soluções dos mesmos. **Resultados:** Foram relatadas sete reclamações (uma da área técnica e seis relacionadas com recepção e coleta). Por meio da utilização das ferramentas foi possível mapear e identificar os problemas, planejar e identificar oportunidades de melhorias nos processos, a fim de promover a garantia da qualidade. **Discussão:** As ferramentas da qualidade, além de permitirem a avaliação do setor, contribuem também para o bom desempenho dos processos e para o alcance e evolução da qualidade em análises clínicas. É necessário haver comprometimento de toda a organização, onde o trabalho de treinamento e reciclagem deve ser constante. **Conclusão:** As ferramentas utilizadas permitiram a melhor visualização dos problemas, facilidade na busca de ações corretivas e preventivas, além de maior confiabilidade.

Palavras-chave

Ferramentas da qualidade; 5W2H; Diagrama de Ishikawa; Gestão laboratorial

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a constante busca por modernização e melhoria da qualidade, que se iniciou na indústria, vem impactando também a área de prestação de serviços. A preocupação com a qualidade não é mais apenas um diferencial, é uma ação imperativa. É um pré-requisito básico para a sobrevivência e a competitividade das organizações, no mundo moderno.^(1,2)

As instituições de saúde já se conscientizaram de que a Gestão da Qualidade é importante para melhoria contínua de seus desempenhos e, como visam atender de forma satisfatória seus clientes, buscam sempre superar as expectativas dos mesmos. Portanto, para que os serviços e produtos oferecidos transmitam aos clientes confiança, credibilidade e satisfação, estes devem ser concebidos dentro de normas e padrões normatizados.^(1,3,4)

A necessidade da Gestão da Qualidade no laboratório de análises clínicas é decorrente do aumento da concorrência

e da maior conscientização dos clientes, que passaram a exigir "exames com qualidade". A qualidade é um processo em permanente evolução, trazendo benefícios, gerando mudanças positivas, criando novas prioridades e produzindo condições de competitividade.^(1,3)

Em todas as áreas de trabalho existem diversos desafios a serem enfrentados pelos profissionais, porém, em especial, na área da saúde, os gestores se deparam com muitos problemas relacionados à falta de recursos materiais e humanos, insuficiência e inadequação de serviços, crescimento contínuo nos gastos e necessidade de aquisição de serviços, além de problemas oriundos de causas judiciais. Por isso, a administração de uma organização de saúde requer competências específicas, uma vez que determinam a capacidade de analisar uma situação, apresentar soluções e resolver problemas, promovendo inovação e progresso das instituições.⁽⁵⁾

Na área da saúde, a qualidade da assistência é de difícil definição, já que vai além do "produto final". Muitas

¹Biomédica, Pós-Graduada em Gestão em Saúde.

²Doutora, Professora da Universidade Federal de Pelotas – CCQFA - Bioquímica.

Artigo recebido em 01/06/2014

Artigo aprovado em 20/11/2014

vezes considerada imprecisa, a qualidade orientada ao paciente pode ser avaliada por uma tríade: estrutura, processos e resultados. A estrutura corresponde às características estáveis da instituição, como área física, recursos humanos, materiais, equipamentos e modelo organizacional. Os processos envolvem o conjunto de atividades desenvolvidas como fluxos, rotinas, relações estabelecidas entre os profissionais e os clientes, desde a busca pela assistência até o diagnóstico e tratamento. E os resultados, correspondem à eficiência nos processos, a fim de se obterem produtos ou serviços desejáveis, retratando os efeitos da assistência na saúde da população.⁽⁶⁾

O serviço prestado pelo laboratório clínico é uma atividade complexa, influenciada por vários fatores internos e ambientais que podem comprometer seus resultados. Esta complexidade na prestação de serviços médico-laboratoriais, evidencia a necessidade dos laboratórios repensarem suas estruturas, seus processos e também suas relações de trabalho, já que seus serviços estão comprometidos com a qualidade dos resultados. A viabilização da gestão da qualidade no processo envolve a implantação evolutiva das atividades em três etapas: (a) a eliminação dos defeitos, garantindo resultados em condições de serem efetivamente utilizados; (b) eliminação das causas dos defeitos, garantindo maior confiabilidade dos resultados; (c) a otimização do processo, levando a resultados com máxima eficiência e eficácia.⁽³⁾

Em um laboratório de análises clínicas, o objetivo é prestar serviços de medicina diagnóstica e assegurar que os resultados emitidos sejam exatos e reflitam, realmente, o estado clínico do paciente, possibilitando o diagnóstico, prognóstico e tratamento precisos.^(7,8) A garantia da qualidade é alcançada tendo-se total e absoluto controle sobre todas as etapas do processo, que compreende as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.⁽⁷⁾ A fase pré-analítica é o momento do primeiro contato com o paciente e inclui orientação e preparação para a coleta de material biológico, além do transporte e armazenamento das amostras. A fase analítica é a realização do exame propriamente dito, onde são gerados os resultados que são validados através da análise do controle interno de qualidade. Já a fase pós-analítica compreende a digitação do laudo e liberação por um profissional habilitado.⁽⁹⁾

É essencial conhecer os processos para gerenciá-los. Este pode ser definido como um conjunto de causas que gera um determinado efeito ou um conjunto de meios para se chegar a um determinado fim. A gestão da qualidade propõe a divisão dos grandes processos em outros menores, para facilitar o controle. Controlando os processos menores, é possível localizar mais facilmente os problemas e agir sobre a causa fundamental.⁽²⁾ Através desse controle, pode-se detectar os problemas, interpretá-los, atuando sobre eles para modificar o resultado, de forma a obtê-los como exatamente planejado e desejado.^(2,10)

Dentro deste enfoque, a utilização de ferramentas da qualidade proporciona meios para definição, mensuração, análise e proposição de soluções que produzam melhorias reais no desempenho dos processos de trabalho.^(6,6) As ferramentas da qualidade podem ser didaticamente divididas em três grandes grupos: (a) ferramentas para identificação dos problemas (folha de verificação, fluxograma, *brainstorming*, Diagrama de Pareto, Estratificação e Diagrama de Ishikawa); (b) ferramentas para análise (Diagrama de Pareto, estratificação, Diagrama de Ishikawa, histograma, carta de controle e fluxograma) e (c) ferramentas para solução dos problemas (5W2H e diagramas). Com base nesta divisão, optou-se neste trabalho por utilizar as ferramentas Diagrama de Causa e Efeito ou Diagrama de Ishikawa (identificação/análise) e 5W2H (solução).

A ferramenta 5W2H permite identificar detalhadamente um processo ou um problema e, a partir de tais informações, pode-se tomar uma decisão mais detalhada e garantir que a operação seja conduzida, sem nenhuma dúvida, por parte dos gestores e sua equipe. Utilizando as perguntas que correspondem ao início da palavra em inglês: *What* (o quê, qual), *Who* (quem), *Where* (onde), *When* (quando), *Why* (por quê), *How* (como) e *How much* (quanto custa), é possível entender melhor um processo ou um problema, sendo utilizada para elaboração de procedimentos e instruções de trabalho. Isso facilita o acompanhamento e avaliação das ações propostas, sendo útil no desenvolvimento de planos de ações para a melhoria dos processos.⁽³⁻⁵⁾

O Diagrama de Ishikawa, também conhecido como Diagrama de Causa e Efeito ou Espinha de Peixe, é utilizado para identificar, explorar, ressaltar e mapear fatores que afetam um problema, separando as causas dos efeitos e identificando as várias causas de um mesmo efeito.^(4,5) Esta ferramenta mostra a relação entre uma característica de qualidade (efeito) e os fatores que a influenciam (causas),⁽⁵⁾ ou seja, as causas estão relacionadas à mão-de-obra, ao método de trabalho (processo), aos materiais e equipamentos utilizados.⁽⁴⁾

Para a elaboração do diagrama, traça-se uma seta, indicando o problema à direita. Desenham-se ramos em formato de espinha de peixe, representando causas potenciais, agrupadas, tendo em vista, algumas regras.⁽⁵⁾ De acordo com as causas apontadas, elas se reorganizam em blocos de problema: matéria-prima, mão-de-obra, meio ambiente, medida de desempenho, métodos e máquinas. A partir desses dados são tomadas as decisões para resolver os problemas.⁽⁴⁾

A implantação de ferramentas de gestão da qualidade viabiliza ações gerenciais, possibilitando a otimização dos processos através da identificação, compreensão e solução de problemas. As ferramentas, Diagrama de Ishikawa e 5W2H, contempladas neste trabalho, são as mais utilizadas na rotina dos laboratórios de análises clínicas, além de serem de simples emprego.

Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo analisar a aplicação das ferramentas da qualidade, Diagrama de Ishikawa e 5W2H, para otimização dos processos em um laboratório de análises clínicas. Através do mapeamento e definição do problema, objetivou-se planejar e identificar oportunidades de melhoria nos processos, a fim de promover a garantia da qualidade. Além disso, objetivou-se contribuir com o acervo científico sobre a utilização destas ferramentas utilizadas na indústria, verificando sua aplicação na área da saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados registros de reclamações de pacientes realizadas através de uma Central de Atendimento ao Cliente de um laboratório de análises clínicas da região do Vale dos Sinos, no período de junho a agosto de 2013.

Este laboratório presta serviços de análises clínicas para pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), atendidos na rede básica, além de convênios e particulares. Aproximadamente, 96% dos atendimentos são provenientes do SUS, sendo realizados, em média, 2.100 atendimentos/mês e 18.000 exames/mês.

A instituição conta com um bom nível de formação dos colaboradores, o que já é um diferencial diante das demais empresas da área da saúde. No setor analítico de produção, sempre está em busca de equipamentos de automação e interfaceamento em todos os setores, o que confere uma maior agilidade na liberação dos laudos.

O laboratório conta com uma Central de Atendimento ao Cliente, e, por meio de uma comunicação telefônica, o paciente registra sua reclamação. O setor de atendimento faz o cadastro da reclamação, em um sistema interno, que permanecerá armazenada e disponível para análise do fato pela direção.

Para obtenção dos dados, estabeleceu-se contato prévio com a Central de Atendimento, que disponibilizou todos

os registros de reclamações de pacientes que ocorreram no período estabelecido, mantendo-se total sigilo acerca da identificação dos reclamantes. Os dados obtidos foram classificados de acordo com o setor envolvido (recepção, coleta, área técnica) e, posteriormente, para cada área, aplicaram-se as ferramentas de gestão, Diagrama de Ishikawa e 5W2H.

O Diagrama de Ishikawa foi traçado de forma gráfica onde o problema ficou posicionado à direita, como se fosse a "cabeça do peixe". Através dos ramos, em formato de espinha de peixe, foram considerados os fatores que afetavam o problema (matéria-prima, mão-de-obra, meio ambiente, medida de desempenho, método e máquinas), o que permitiu apontar as causas potenciais que poderiam ter gerado uma reclamação, por parte do paciente.

Já a ferramenta 5W2H foi desenvolvida em forma de tabela, envolvendo as perguntas e respostas relacionadas: *What* (o quê, qual), *Who* (quem), *Where* (onde), *When* (quando), *Why* (por quê), *How* (como) e *How much* (quanto custa). Dessa forma, elaborou-se um plano de ação possível de desenvolver propostas e procedimentos para a melhoria dos processos deste laboratório.

RESULTADOS

Dentro do período observado, o laboratório apresentou, ao todo, sete reclamações. Duas reclamações oriundas de mal atendimento, duas por demora no atendimento e agendamento, uma por falta de instrução de coleta (jejum), uma devido à coleta difícil, realizada em criança, e uma reclamação de atraso na liberação do resultado.

A partir desses dados, foi elaborado um Diagrama de Ishikawa que permitiu uma análise detalhada e criteriosa dos processos que envolveram os fatos e das possíveis causas que contribuíram para estas reclamações. Estes dados foram divididos em dois setores: setor recepção/coleta (Figura 1) e setor de área técnica (Figura 2).



Figura 1. Diagrama de Ishikawa - Reclamações que envolveram o Setor Recepção/Coleta

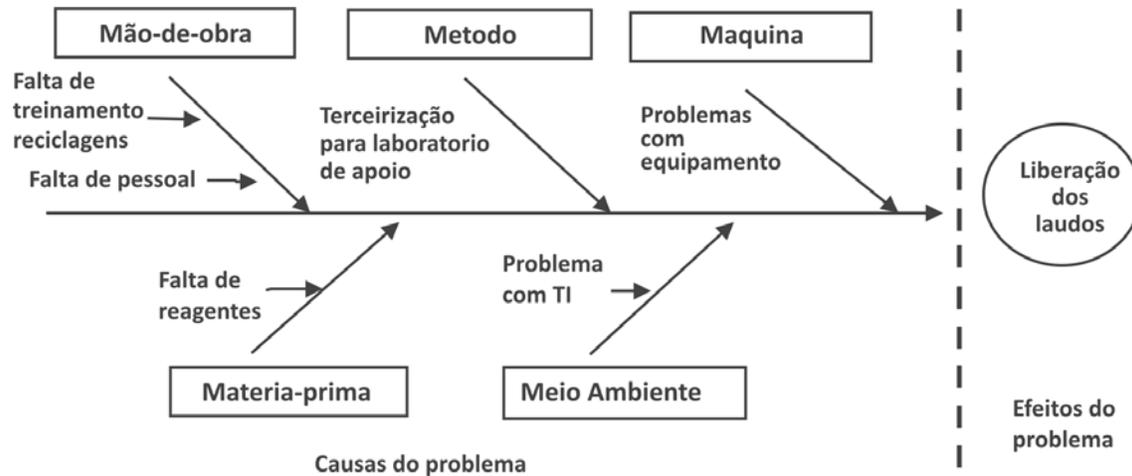


Figura 2. Diagrama de Ishikawa - Reclamações que envolveram o Setor Área técnica

Após esse processo, aplicou-se a ferramenta 5W2H, onde foi possível elaborar um plano de ação para propor melhorias nos processos deste laboratório. (Figura 3 e Figura 4).

O quê?	Elaboração de programa de treinamento e capacitação dos setores de coleta e recepção
Quem?	Gerentes de unidades e todos os setores envolvidos com coleta e recepção
Onde?	Em todas as unidades
Quando?	A partir de janeiro de 2014 e periodicamente a cada 6 meses
Por quê?	Para promover melhorias no atendimento/recepção, coleta e triagem
Como?	Através de treinamento e reciclagem
Quanto custa?	R\$ 4,50 por hora de treinamento de cada Colaborador

Figura 3. 5W2H Plano de ação para melhorias no setor Recepção/ Coleta.

O quê?	Liberação de resultados/Área técnica
Quem?	Gerente técnico
Onde?	Em todas as unidades
Quando?	A partir de janeiro de 2014
Por quê?	Para promover melhorias na área técnica a fim de cumprir o prazo de entrega de resultados
Como?	Através de treinamento e reciclagens. Fazer checklist semanalmente. Manutenções preventivas nos equipamentos.
Quanto custa?	R\$ 4,50 por hora de treinamento de cada colaborador

Figura 4. 5W2H – Plano de ação para melhorias do Setor Área Técnica.

DISCUSSÃO

Em sua grande maioria, os laboratórios são gerenciados por profissionais da área técnica, sejam farmacêuticos-bioquímicos, biomédicos ou médicos, sendo que muitos desses contam, quase que exclusivamente, com conhecimentos empíricos sobre o processo de administração e gestão. Isso impossibilita, e muitas vezes inviabiliza, o negócio, já que, junto a este cenário, há também altos investimentos, exigências legais, ética profissional, concorrência acirrada, condições macroeconômicas complexas, entre outras.⁽¹¹⁾

Inúmeros hospitais, clínicas, laboratórios e outras instituições prestadoras de serviços praticam os princípios de qualidade, de maneira independente ou orientados por instituições de assessoria que vieram surgindo ao longo do tempo. De qualquer forma, os melhores e mais consistentes resultados são obtidos com uma liderança forte e de forma sistêmica, incorporando os conceitos e práticas da gestão pela qualidade em seu dia-a-dia, exercitando-os continuamente como um hábito de trabalho.⁽²⁾

É importante que os laboratórios de análises clínicas, através das ferramentas de gestão da qualidade, elaborem planos de controle de qualidade, a fim de registrar e identificar ações corretivas em todos os processos.⁽¹²⁾

A busca contínua pela otimização dos processos em análises clínicas, além de visar a qualidade do diagnóstico com base na melhor conduta médica ao paciente, é fundamental para a diminuição do custo e tempo de execução, aumentando o desempenho e lucratividade da organização.⁽²⁾

Através da avaliação dos dados aqui apresentados, foi possível verificar a importância das ferramentas da qualidade não somente para as avaliações do setor, como também para o bom desempenho dos processos e para o alcance e evolução da qualidade na área de análises

clínicas. A melhoria da qualidade está relacionada com o comprometimento de toda a organização e, muitas vezes, necessita de mudança de cultura da instituição, sendo este um trabalho permanente.

O trabalho de reciclagens e treinamentos dos funcionários tem como objetivo a otimização dos processos em geral, onde são revisados e reforçados todos os procedimentos, incluindo a prática de alimentar constantemente os registros e formulários.⁽⁵⁾

Além dos aspectos de insatisfação originados pelas reclamações dos pacientes/clientes, outros problemas ainda maiores para o laboratório, principalmente em relação à sua reputação no mercado, podem surgir como decorrência do descontentamento. Neste sentido, poderá haver diversas ações, como por exemplo, o paciente poderá vir a mudar de laboratório (em caso de pacientes que necessitam frequentemente de assistência), comunicar a sua experiência negativa aos amigos e à comunidade em geral ou, até mesmo, recorrer aos órgãos judiciais.⁽⁶⁾ Por isso, é necessário gerenciar, efetivamente, os processos, para desenvolver relacionamentos de longo prazo e minimizar os efeitos da propaganda negativa.

As ferramentas da qualidade contribuem com o processo gerencial dos laboratórios de análises clínicas, uma vez que permitem a visualização das causas que levaram a um determinado problema, facilitando a solução e resolução destes, diminuindo os custos para a instituição e assegurando aos clientes melhores serviços.⁽²⁾

Somado a isso, evidencia-se a importância de investimentos em padronização dos processos, bem como a necessidade de treinamentos e reciclagens de seus colaboradores, o que pode ser feito através de capacitação e remanejamento de setores. A rotatividade é de grande valia para se evitar o comodismo e aumentar a motivação da equipe.

Frequentemente se verifica que as reclamações não chegam até à central de atendimento ou mesmo são induzidas pelo funcionário no ato do atendimento. Com isso, a empresa é privada de informações importantes sobre a qualidade dos seus serviços e perde a oportunidade de evitar e remediar problemas, além de não ter condições de rever seus processos e realizar melhorias.

CONCLUSÕES

A utilização das ferramentas da qualidade confere ao laboratório de análises clínicas, além de maior confiabilidade, também facilidades na sua gestão, pois permitem uma melhor visualização dos problemas, além de facilitar a busca de ações corretivas e preventivas. Dispor de informações reais sobre o que está ocorrendo, modifica a abordagem dos problemas, focando na sistematização dos dados e permitindo a projeção real das soluções, o que elimina a possibilidade de busca de soluções empíricas.

É importante ressaltar que as ferramentas da qualidade não se restringem apenas à resolução de problema e que sua aplicação deve ocorrer também no âmbito estratégico, tático e operacional.

Abstract

Background: Quality tools are management techniques in order to define, measure, analyze, and propose solutions that interfere in the commercial and business institutions, for example, in the clinical analysis laboratory, facilitating the solution and resolution of these, reducing the costs for the institution and assuring to the clients the provision of most qualified services. **Objective:** Analyze the application of quality tools, Ishikawa Diagram and 5W2H, for management process optimization in a clinical laboratory analysis. **Methods:** Were analyzed records of complaints of patients in a Clinical Laboratory Analysis of the Vale dos Sinos region in the period from June to August 2013. Was used Ishikawa Diagram for identification and analysis of complains and 5W2H to proposition solutions the same. **Result:** Were reported seven complains (1 technical area, 6 related to reception and collecting). Through the use of tools, it was possible to map and identify the problem, plan and identify opportunities for process improvements in order to promote quality assurance. **Discussion:** The quality tools, not only allow the assessment of the section, but also contribute to the performance of processes and the scope and quality evolution in clinical analysis. There needs to be commitment of the organization where the work of training and recycling must be constant. **Conclusion:** The tools used a better the view of the problems, facilitating the search for corrective and preventive actions, and more reliability.

Keywords

Quality tools; 5W2H; Ishikawa Diagram; Laboratory management

REFERÊNCIAS

- Lopes HJJ. Garantia e controle de qualidade no laboratório clínico. Assessoria Científica Gold Analisa - Diagnóstica. Belo Horizonte. 2003.
- Nogueira LCL. Gerenciando pela qualidade total na saúde. 3. ed. Nova Lima: INDG tecnologia e serviços, 2008.
- Motta VT, Corrêa JA, Motta LR. Gestão da Qualidade no Laboratório Clínico. 2a ed. Caxias do Sul: Médica Missau, 2001.
- Tajra SF. Gestão estratégica na saúde: reflexões e práticas para uma administração voltada para a excelência. 2a ed. São Paulo: Látria, 2009.
- Feldman LB. Indicadores, auditorias, certificações: ferramentas de qualidade para Gestão em saúde. 2a ed. São Paulo: Martinari, 2010.
- Pertence PP, Melleiro MM. Implantação de ferramenta de gestão de qualidade em hospital universitário. Rev Esc Enferm USP. 2010; 44(4):1024-31.
- Chaves CD. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(5): 352.
- Machado BSB, Viega MC. Estudo de caso: as ferramentas da qualidade utilizadas no laboratório de análises clínicas de um hospital para a otimização de processos. UNOPAR Cient Ciênc Jurid Empres. 2012; 13(1): 65-9.
- Comissão de Análises Clínicas do Conselho Federal de Farmácia. Gestão da Qualidade Laboratorial: é preciso entender as variáveis para controlar o processo e garantir a segurança do paciente. Disponível em: <http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/132/encarte_analises_clinicas.pdf>. acesso em: 24 março. 2014.

10. Souza MA, Silva MAMA. Adequação de ferramentas de gestão da qualidade às clínicas de saúde. Sem Est Prod Acad. 2007; 11(1): 1-19. Disponível em: <<http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa/article/download/293/241>>
11. Becker AA. A gestão do laboratório de análises clínicas por meio de indicadores de desempenho através do balanced scorecard. Dissertação: Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
12. Rodrigues JS, Tavares RG. Avaliação das não-conformidades em coletas de sangue como indicador da qualidade da fase pré-analítica. LaesHaes. 2014 Fev/Mar;207:151-4.

Correspondência

Rejane Giacomelli Tavares

*Prédio Bioquímica- Sala 302 A - Centro de Ciências Químicas,
Farmacêuticas e de Alimentos
Campus Universitário Capão do Leão, S/N
96160-000
Email: tavares.rejane@gmail.com
Telefone: + 55 (53) 3275-7355*

Interferência de medicamentos no parcial de urina

Interference of drugs in partial urine

Caoana Piccinin

Resumo

A análise de urina foi o início da medicina laboratorial. Nos dias de hoje, o exame de urina ou parcial de urina é um exame de rotina, em que se examina a parte física, química e microscópica da urina com o objetivo de se avaliarem alterações do sistema urinário. Este estudo investiga medicamentos que podem causar interferências no resultado desse exame. A ação de medicamentos que causam interferências pode levar a resultados discrepantes, e, para serem evitados ou minimizados, deve haver comunicação entre o laboratório clínico e o paciente.

Palavras-chave

Exame de urina; Medicamentos; Interferência

INTRODUÇÃO

Os médicos da Antiguidade, embora não contassem com métodos sofisticados para realizar as análises de urina, eram capazes de obter informações diagnósticas de observações básicas como cor, odor, turvação, volume, viscosidade e, até mesmo, a presença de açúcar.⁽¹⁾

O trato urinário é um dos locais mais comuns de infecções bacterianas, principalmente em mulheres.⁽²⁾ Após a infecção primária, muitas vezes esses processos permanecem latentes no trato urinário e podem reativar ao longo da vida.⁽³⁾

A análise do sedimento urinário fornece informações essenciais sobre o estado funcional dos rins. Esse exame é um procedimento de alta demanda, que requer um trabalho intenso e que apresenta como complicações grande variabilidade e pouca padronização.^(4,5)

EXAME FÍSICO DA URINA

A cor da urina varia de incolor a negra, em decorrência de funções metabólicas normais, atividade física, substâncias ingeridas ou patologias.⁽⁶⁾ Apresentações anormais de coloração da urina incluem cores que vão de rosa a marrom. Um exemplo de coloração alterada (tom avermelhado) é aquela produzida pelo uso da rifampicina.⁽⁷⁾

No aspecto da urina, observa-se a transparência/turvação de uma amostra, através de exame visual. A urina normal é límpida. A presença de células epiteliais escamosas e muco podem resultar em urina turva (turvação não patológica).⁽⁶⁾ As causas mais frequentes da turvação patológica são a presença de glóbulos vermelhos (GVs), glóbulos brancos (GBs) e infecção causada por bactéria ou doença orgânica sistêmica.

As bactérias não estão presentes na urina. Sua presença pode ser indicativa de infecção do trato urinário.⁽⁶⁾

A urina recente tem odor aromático,⁽⁶⁾ no entanto, esse odor também pode ser indicativo de várias alterações metabólicas. Um exemplo é a doença urinária conhecida como Xarope de Bordo (Leucinose),⁽⁷⁾ uma doença autossômica recessiva rara em que, devido à deficiência do complexo enzimático desidrogenase dos ácidos ceto- α de cadeia ramificada, há acúmulo de aminoácidos leucina, isoleucina, valina e aloisoleucina e seus produtos metabólicos, levando à disfunção cerebral grave.⁽⁸⁾

ANÁLISE QUÍMICA DA URINA

A análise química da urina é realizada por tiras-reativas, sendo observados o pH, densidade, presença de proteínas, glicose, cetonas, sangue, bilirrubina, urobilinogênio, nitrito e leucócitos.⁽⁶⁾

Importa considerar que fitas reativas consistem em almofadas absorventes impregnadas com substâncias químicas aderidas a uma tira de plástico. Nestas, ocorre uma reação química quando a almofada entra em contato com a urina, que é interpretada pela comparação da cor produzida na almofada com uma tabela fornecida pelo fabricante. O tempo necessário para essas reações varia de um a dois minutos, dependendo do fabricante.⁽⁶⁾

O pH das amostras normais pode variar de 4,5 a 8,0, sendo que certos distúrbios metabólicos e infecções podem alterar este parâmetro.⁽⁶⁾

Indivíduos normais excretam menos de 100 a 150 mg de proteínas por dia,⁽⁹⁾ sendo a proteinúria um dos principais indícios de doença renal.⁽⁶⁾

Instituto Federal do Paraná, Palmas, PR.

Artigo recebido em 17/01/2011

Artigo aprovado em 20/11/2014

A pesquisa de glicose é uma das análises químicas mais importantes do exame de urina, pois pode conduzir ao diagnóstico de *diabetes mellitus*.

As cetonas representam produtos intermediários do metabolismo de lipídios (acetona, ácido acetoacético e ácido beta-hidroxibutírico). Causas que podem levar à presença de cetonas na urina são o *diabetes mellitus* tipo I, quadro febril e jejum prolongado.

O sangue pode estar presente na urina na forma de glóbulos vermelhos intactos (hematúria) ou como produto da destruição desses (hemoglobinúria).

A bilirrubina pode fornecer indicação precoce de doença hepática. Quando bilirrubina conjugada é excretada, através do ducto biliar, para o intestino, as bactérias intestinais convertem a bilirrubina em uma combinação de urobilinogênio e estercobilinogênio, sendo o urobilinogênio detectado pelas fitas reativas.

O teste das tiras-reagentes para nitrito oferece um método rápido de triagem para a presença de infecção do trato urinário (ITU), pois boa parte dos uropatógenos reduz nitrito a nitrito.

A adição de teste para gravidade específica (densidade), nas tiras-reagentes, eliminou uma etapa mais laboriosa da urinálise, fornecendo um método conveniente para a rotina,⁽⁶⁾ substituindo o refratômetro. Porém, segundo um estudo realizado por Costa et al.,⁽¹⁰⁾ tiras reagentes não são tão confiáveis para medir a gravidade específica da urina quanto o método do refratômetro.

O EXAME MICROSCÓPICO DE URINA

A análise microscópica da urina fornece informações úteis que são de fácil execução e baixo custo. No entanto, necessita de profissional capacitado para uma avaliação criteriosa.⁽¹¹⁾ O sedimento de urina normal pode conter uma variedade de elementos, como GVs, GBs, cilindros, bactérias e cristais. Contudo, urinas normais, geralmente, apresentam pequena quantidade desses elementos.⁽⁶⁾ No exame microscópico de urina, é revelada a presença de sedimento não organizado: uratos amorfos, cristais de ácido úrico e fosfatos amorfos e sedimento organizado: células epiteliais, leucócitos, hemácias e bactérias.⁽¹²⁾

INTERFERÊNCIAS

Com base nos dados recentes, publicados por Ferreira et al.,⁽¹³⁾ sabe-se que aproximadamente 68 a 93% dos erros laboratoriais são consequência da falta de padronização na fase pré-analítica.

A fase pré-analítica consiste na preparação do paciente, coleta, manipulação e armazenamento da amostra, antes da determinação analítica.

Uma série de drogas é conhecida por afetar os resultados de testes laboratoriais e a urina é um dos analitos também afetados.⁽¹⁴⁾ A interferência de medicamentos em análises clínicas, de fato, assume importante papel na rotina

do laboratório.⁽¹³⁾ O efeito das drogas nos testes laboratoriais apresenta dois mecanismos: a interferência fisiológica e a interferência química. A interferência fisiológica ocorre quando a droga causa alteração a nível corporal (*in vivo*) e as químicas, quando uma propriedade física ou química da droga interfere com a reação do teste (*in vitro*).

Um exemplo de interferentes são as cefalosporinas,⁽¹⁵⁾ antibióticos betalactâmicos,⁽¹⁶⁾ de 2ª e 3ª geração, que são excretadas por via renal e podem causar interferências *in vivo* ou *in vitro*. *In vitro*, interagem com a solução de picrato alcalino, aumentando a concentração de creatinina de 1,5 a 8,5 vezes. *In vivo* causam disfunção renal, aumentando a concentração da creatinina, o que pode ser observado até 20 minutos após a administração da droga.⁽¹⁵⁾

A creatinina é o marcador mais usado para o rastreamento da disfunção renal.⁽¹⁷⁾ A sua excreção depende de fatores como massa muscular e balanço hormonal.⁽¹⁸⁾ As concentrações de creatinina estão sujeitas à interferência de grande amplitude, sendo clinicamente significativas.⁽¹⁹⁾

Quando administradas drogas como fenazopiridina, para infecção do trato urinário, a urina pode vir a ter cor amarela escura ou alaranjada. Além da alteração da cor, essa droga pode falsear o aumento da quantidade de cetonas presentes na urina.⁽¹⁹⁾

A nitrofurantoina, antibiótico administrado para infecção do trato urinário, pode levar a amostra de urina a ter cor laranja escuro, o que interfere na leitura das fitas reagentes, praticamente inutilizando seus resultados.⁽⁶⁾

A amitriptilina, um antidepressivo, produz, na urina, uma cor azul-esverdeada.⁽⁶⁾

A rifampicina (empregada no tratamento para tuberculose) leva a urina a ter cor avermelhada, interferindo principalmente, com a determinação de glicose e hemoglobina.⁽⁶⁾

O metronidazol, um antiprotozoário, escurece a urina, deixando-a enegrecida após a coleta.^(6,20-22)

Sabe-se que, a despeito da prescrição do ácido acetilsalicílico, que tem ação analgésica, anti-inflamatória, antitérmica e antiagregante plaquetária,^(23,24) um número considerável de pacientes faz uso desse fármaco de maneira inadequada.⁽²³⁾ O ácido acetilsalicílico também afeta uma série de exames laboratoriais, incluindo o exame de urina, ocorrendo mudanças (aumento) significativas nos valores de teste para cloreto, proteínas, cálcio, ácido úrico e bilirrubina. Além disso, o pH da urina pode diminuir, drasticamente, após o uso dessa substância.⁽²⁵⁾

Segundo a literatura, os compostos fenólicos apresentam acentuada capacidade antioxidante e tal atividade pode ser considerada superior à da vitamina C (ácido ascórbico). Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas medicinais e, da mesma forma, podem provocar interferências em análises laboratoriais. Como boa parte das reações que ocorrem na fita reativa de urina são do tipo oxidação-redução, compostos fenólicos e vitamina C podem interferir significativamente em determinações de glicosúria, hematúria e hemoglobinúria, obtendo-se resultados falsamente diminuídos.⁽²⁶⁾

No exame de hematúria, que tem por finalidade a triagem e o diagnóstico de desordens do trato geniturinário e a triagem para excesso de medicação anticoagulante, as interferências que podem ser observadas são decorrentes de drogas como rifampicina, fenolftaleína, iodetos, brometos, cobre, agentes antioxidantes e permanganato, que determinam resultados falso-positivos. O ácido ascórbico provoca, neste exame, um resultado falso-negativo.⁽⁷⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa bibliográfica mostrou medicamentos que interferem no exame de urina. A interferência destes medicamentos é frequente em análises clínicas, mas podem ser evitados, se o laboratório mantiver um diálogo com o paciente antes da realização do exame.

Devido ao grande número de fármacos disponíveis no mercado e o crescente problema da automedicação, as interferências causadas nos exames laboratoriais aumentam progressivamente e podem interferir no julgamento e tomada de decisão do médico assistente, trazendo prejuízos à saúde dos indivíduos.

Abstract

The urine analysis was the beginning of laboratory medicine. These days, the urine test, partial urine, is a routine exam, which examines the physical part of urine chemistry and microscopy, which is used to evaluate changes in the urinary system. This study provides some medicines that can cause interference with the results of urinalysis. The action of these drugs that cause interference may lead to discrepant results, which can only be avoided or minimized if communication between the clinical laboratory and patient.

Keywords

Urinalysis; Drugs; Interference

REFERÊNCIAS

- Colombeli ASS, Falkenberg M. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(2):85-93.
- Martins F, Vitorino J, Abreu A. Evaluation of the antimicrobial susceptibility profile of microorganisms isolated from urine in the region of Vale do Sousa and Tâmega. *Acta Med Port.* 2010;23(4):641-6. [Article in Portuguese]
- Courtade-Saïdi M, Aziza J, Collin L, d'Aure D. Urine cytology pitfalls due to Polyomaviruses. *Ann Pathol.* 2010;30(3):176-81. Article in French].
- Bottini PV, Garlipp CR. Urinalise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(3):157-62. [online]. Disponível em 27/12/2010.
- Silva, Sueli Riul da., Nascimento, Talita Garcia do. Leucocitúria em pacientes submetidas a quimioterapia e coleta de urina. *Rev. bras. enferm.* [online]. 2010, vol.63, n.4, pp. 616-22. Disponível em 27/12/2010.
- Strasinger SK. Uroanálise e fluidos biológicos. 3a. ed. São Paulo: Premier, 1996.
- Wallach JMD. Interpretação de Exames Laboratoriais. 7a. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- Couce Pico ML, Castiñeiras Ramos DE, Bóveda Fontán MD, Iglesias Rodríguez AJ, Cocho de Juan JA, Fraga Bermúdez JM. Advances in the diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: experience in Galicia (Spain). *An Pediatr (Barc).* 2007;67(4):337-43. [Article in Spanish]
- Sousa CAM de, et al. Concentração de proteínas na urina de indivíduos normais. *Rev Saúde Públ.* 1973;7: 405-8.
- Costa CE, Bettendorff C, Bupo S, Ayuso S, Vallejo G. Comparative measurement of urine specific gravity: reagent strips, refractometry and hydrometry. *Arch Argent Pediatr.* 2010;108(3):234-8. [Article in Spanish]
- Kanbay M, Kasapoglu B, Perazella MA. Acute tubular necrosis and pre-renal acute kidney injury: utility of urine microscopy in their evaluation- a systematic review. *Int Urol Nephrol.* 2010; 42(2):425-33.
- Rocabado MM, Ibáñez OZ. Infeccion urinaria em mujeres adolescentes. *Revista Médica.* 1996;16:38-42.
- Ferreira BC, Santos KL, Rudolph SC, Alcanfor JDX, Cunha LC. Estudo dos medicamentos utilizados pelos pacientes atendidos em laboratório de análises clínicas e suas interferências em testes laboratoriais. *Revista Eletrônica de Farmácia.* 2009;6(1):33-43.
- Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem.* 1975;21(5):1D-432D
- Giacomelli, LRB, Pedrazzi AHP. Interferência dos Medicamentos nas Provas Laboratoriais de Função Renal. *Arquivos Ciência Saúde. Unipar, Paraná;* 2001;1(5):79-85.
- González-Mejía EB, Valenzuela EM, Mantilla-Anaya JR, Leal-Castro AL, Saavedra-Trujillo CH, Eslava-Schmalbach J, et al. Resistance to cefepime in Enterobacter cloacae isolates from hospitals in Bogotá, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2006;8(2):191-9. [Article in Spanish]
- Lessa I. Níveis séricos de creatina: hipercreatinemia em segmento da população adulta de Salvador, Brasil. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7(2):176-86.
- Martins, IS. Excreção de creatinina no período de vinte e quatro horas, em crianças de cinco a onze anos de idade. *Rev. Saúde Pública.* 1974;8(1):63-6.
- V236 Drug Interference with Diagnostic Testing Katrina L. Mealey Washington State University Pullman, WA, USA. [s.d.].
- Natal S, Valente JG, Sanchez AR, Penna MLF. Resistência a isoniazida e rifampicina e história de tratamento anterior para tuberculose. *Cad. Saúde Pública.* 2003;19(5):1277-81.
- Hernández E, Cardona-Castro N, Rodríguez G, Villegas S, Beltrán C, Kimura M, et al. Study of rifampin and dapsone resistance in three patients with recurring leprosy. *Rev Panam Salud Publica.* 2008;23(2):73-7. [Article in Spanish]
- Pépin J, Sobela F, Khonde N, Agyarko-Poku T, Diakité S, Deslandes S, et al. The syndromic management of vaginal discharge using single-dose treatments: a randomized controlled trial in West Africa. *Bull World Health Organ.* 2006;84(9):729-38. [online]. Disponível em 27/12/2010.
- Oliveira DC de, Silva RF, Silva DJ, Lima VC de. Resistência à aspirina: realidade ou ficção? *Arq Bras Cardiol.*, vol. 95, n. 3: pp. e91-e94, [online]. 2010. Disponível em 27/12/2010.
- FURP - Fundação para o Remédio Popular. *Memento Terapêutico.* Guarulhos SP, 1997.
- Routh JI, Paul WD. Assessment of interference by aspirin with some assays commonly done in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 1976;22(6):837-4.
- Passos AM, Alexandre RF, Sander R, Jacques A, Carloto MS, Simões CM, et al. Potenciais interferências nos resultados de exames laboratoriais causadas pelo uso de plantas medicinais por Pacientes HIV+ e/ou com AIDS Latin American. *Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense) Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 28, n. 1: p. 196-202, 2009.

Correspondência

Caiana Piccinin

Instituto Federal do Paraná

85555-000 – Palmas, PR

caonapiccinin@hotmail.com

Ocorrência de enteroparasitos em crianças de creche no município de São João da Boa Vista, SP

Enteroparasites occurrence in day care children in the municipality of São João da Boa Vista, SP

Eliana Anunciato Franco de Camargo¹

Michele Simões dos Santos²

Resumo

Objetivo: Esta pesquisa avaliou a ocorrência de parasitos intestinais em estudantes do município de São João da Boa Vista, SP. **Métodos:** Foram examinadas 67 amostras de fezes no período de março a agosto de 2013, segundo os métodos de Hoffman, Pons & Janer, Willis e Rugai, Mattos & Brisola. **Resultados:** A prevalência geral de infecção foi de 19,4%. Helmintoses não foram observadas e *Giardia duodenalis* foi o único protozoário parasito verificado. **Conclusão:** Conclui-se que a prevalência de enteroparasitoses no grupo estudado é menor que o esperado o que provavelmente deva ser consequência das boas condições socioeconômicas e sanitárias presentes no ambiente escolar e na comunidade em que as crianças estão inseridas

Palavras-chave

Saúde Pública; Prevenção de Doenças; Parasitos

INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses constituem um grave problema de saúde pública^(1,2) e acometem, principalmente, crianças em idades pré-escolar, escolar e adultos jovens, cuja transmissão associa-se aos precários hábitos higiênicos característicos da idade, bem como precárias condições de saneamento básico, baixo nível de informação e conhecimento da população e, ainda, ao contato pessoa-a-pessoa, proporcionado por ambientes fechados e com aglomerações.^(3,4)

Em decorrência da urbanização e da intensa participação feminina no mercado de trabalho, as creches passaram a ser, posteriormente ao ambiente domiciliar, o local mais frequentado por crianças de várias faixas etárias e, por isso, dependendo de condições específicas, podem se tornar potenciais locais de contaminação de parasitoses.^(5,6)

Neste contexto, a frequência à creche, considerando o contato interpessoal, exploração da fase oral das crianças e contato com o solo, pode aumentar a probabilidade das crianças adquirirem algum tipo de infecção.⁽⁷⁾ Deve-se considerar que a presença de enteroparasitos em escolares pode comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo dos infectados.^(1,8,9)

Este estudo teve como objetivos conhecer a prevalência das principais enteroparasitoses em crianças de 0 a 5 anos de idade, matriculadas na creche Casa da Criança no município de São João da Boa Vista e investigar a possibilidade de associação entre a ocorrência dessas parasitoses e condições socioeconômicas das crianças.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de 67 amostras de fezes e dos dados socioeconômicos foi realizada no período de março a agosto de 2013, com crianças residentes no município de São João da Boa Vista, SP, e matriculadas na creche Casa da Criança, Vila Conrado, neste mesmo município, uma associação civil de direito privado, sem fins lucrativos, a qual atende crianças com idades entre 4 meses e 5 anos

Inicialmente, foram realizadas reuniões com a direção da escola e, posteriormente, com os pais e responsáveis pelos alunos para apresentação dos propósitos da investigação e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após os esclarecimentos, todos aqueles que demonstraram interesse em participar, assinaram o TCLE e responderam o questionário socioeconômico. Para os pais e responsáveis que não compareceram às reuniões,

¹Mestre, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP.

Professora, Curso de graduação em Farmácia, Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, SP.

²Graduanda. Curso de graduação em Farmácia, Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, SP.

Artigo recebido em 28/08/2013

Artigo aprovado em 26/09/2014

Conflito de interesse: Não há conflitos de interesse

esclarecimentos adicionais foram prestados, no momento da entrada das crianças na creche, e, também, via caderno de recados.

Todos que autorizaram a participação das crianças receberam um kit contendo um coletor de fezes, previamente identificado com os dados da criança, uma espátula e um comunicado instruindo a forma de coleta das fezes e a data de devolução do material à creche. O comunicado foi direcionado, conforme a faixa etária das crianças, e a coleta das fezes foi realizada pelos pais ou responsáveis.

Para os integrantes do berçário (crianças com 1 ano de idade), o material foi colhido diretamente das fraldas, imediatamente após a evacuação. Para o restante das crianças, as fezes foram colhidas em recipiente limpo e transferidas para o coletor. Crianças menores de 1 ano de idade não participaram da pesquisa em virtude da não aceitação dos pais ou responsáveis. Todo o material colhido foi armazenado em geladeira e transportado até o laboratório de análises clínicas, em caixa termoisolante de poliestireno, refrigerada com gelo.

As amostras recebidas foram processadas e analisadas utilizando-se os métodos de sedimentação espontânea (Hoffman, Ponz & Janer), flutuação em solução saturada de cloreto de sódio (Willis) e Rugai, Mattos e Brisola no Laboratório Labaclini, também localizado no município de São João da Boa Vista.

ÉTICA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Ensino, Pesquisa e Extensão do UNIPINHAL (CEPEX) sob número 750/13 e dele recebeu aprovação.

RESULTADOS

Foram analisadas 67 amostras através de exames coproparasitológicos, entre os quais 36 (53,73%) pertencentes a crianças do sexo masculino e 31 (46,27%) do sexo feminino. Os indivíduos investigados apresentaram a seguinte distribuição etária: 1 ano (22,39%), 2-3 anos (40,30%), e 4-5 anos (37,31%).

Todas as famílias das crianças analisadas responderam o questionário socioeconômico proposto. A questão referente à escolaridade dos pais ou responsáveis demonstrou que a maioria possui ensino médio completo (38,89%) (Tabela 1).

Em relação à renda familiar mensal, foi possível observar que 38,81% das famílias pesquisadas vivem com dois salários mínimos mensais (Tabela 2).

Sobre as condições de saneamento básico, os questionários informaram que o maior percentual (94,03%) de residências tinha esgoto (Tabela 3). Também foi possível verificar que 89,55% das famílias utilizavam água oriunda da rede pública de distribuição (Tabela 4) e 46,27% utilizavam água filtrada em sua residência (Tabela 5).

Tabela 1 - Escolaridade dos pais ou responsáveis das crianças pesquisadas

Grau de escolaridade	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Não alfabetizado	0	0
Ensino fundamental incompleto	17	13,49
Ensino fundamental completo	16	12,70
Ensino médio incompleto	14	11,11
Ensino médio completo	49	38,89
Superior incompleto	6	4,76
Superior completo	16	12,70
Não responderam	8	6,35
Total	126	100

Tabela 2 - Renda familiar mensal das famílias pesquisadas

Renda familiar mensal	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Menos de 1 salário mínimo	1	1,49
1 salário mínimo	11	16,42
2 salários mínimos	26	38,81
3 ou mais salários mínimos	20	29,85
Não responderam	9	13,43
Total	67	100

Tabela 3 - Tipo de saneamento básico que as famílias possuem em suas residências

Tipo de saneamento básico	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Fossa	2	2,99
Vala	0	0
Esgoto	63	94,03
Terreno	2	2,99
Córrego	0	0
Total	67	100

Tabela 4 - Origem da água utilizada nas residências das famílias pesquisadas

Origem	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Rede pública de distribuição	60	89,55
Poço	2	2,99
Mina	0	0
Outros	4	5,97
Não responderam	1	1,49
Total	67	100

Tabela 5 - Tipo de tratamento dado a água utilizada nas residências

Manejo	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Filtrada	31	46,27
Não filtrada	18	26,87
Fervida	1	1,49
Uso de hipoclorito	0	0
Nenhum	11	16,42
Não Responderam	6	8,96
Total	67	100

Quanto ao destino dos resíduos domiciliares produzidos pelas famílias, 97,01% responderam que os resíduos eram recolhidos por empresa especializada (Tabela 6).

Tabela 6 - Destino dos resíduos domiciliares produzidos nas residências

Destino	Nº de questionários respondidos	Frequência (%)
Recolhidos por empresa	65	97,01
Queimados	1	1,49
Jogados no rio	0	0
Jogados em lotes baldios	1	1,49
Outros	0	0
Total	67	100

Sobre a prevalência de enteroparasitoses observou-se que 19,4% das crianças estavam parasitadas. Destas, nenhum caso foi observado na faixa etária de 1 ano, 69,2% foram verificados na faixa dos 2-3 anos de idade e 30,8%, na faixa dos 4-5 anos. Foram encontradas quatro amostras positivas para *Entamoeba coli* e três amostras positivas para *Endolimax nana*, não se observando nenhum caso de poliparasitismo.

Não foi possível indicar, mediante os resultados obtidos, relação entre casos de parasitismo e ausência de condições básicas de saneamento. Crianças que residiam em casas sem esgoto se mostraram infectadas na mesma proporção que as residentes em casas com esgoto encanado.

Todos os pais e responsáveis pelos alunos que apresentaram resultado positivo foram orientados a procurar o serviço de saúde local, para tratamento adequado.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vários pesquisadores atentaram para a ocorrência de enteroparasitoses em crianças que frequentam creches e relataram a importância desses ambientes na epidemiologia das parasitoses. As creches albergam crianças de diferentes procedências, gêneros, idades e níveis socioeconômicos. A transmissão de enteroparasitos depende da presença de indivíduos infectados, de deficiências no saneamento básico e higiene pessoal, sendo indicativo da necessidade de intervenções sociais, sanitárias ou culturais nas comunidades infectadas.^(2,6,15,23,24)

Nesta pesquisa, os resultados indicaram a presença de apenas um tipo de enteroparasito (*Giardia duodenalis*) associado a dois tipos de protozoários comensais não patogênicos (*Entamoeba coli* e *Endolimax nana*). A giardíase é uma enteroparasitose comum em crianças em idade pré-escolar e escolar, especialmente naquelas incluídas na população pediátrica.⁽¹¹⁻¹³⁾ Muitos trabalhos têm demonstrado taxas de prevalência significativa em crianças atendidas por creches, onde observam-se índices mais elevados que na população em geral.^(15,25) A justificativa para tais resultados se prende ao fato de que crianças, nessa fase, desconhecem princípios básicos de higiene, apresentam hábitos

característicos que favorecem a transmissão e ausência de imunidade a reinfecções.⁽¹⁴⁾

Estudos mostram que a ocorrência de giardíase em crianças varia grandemente. As diferenças comportamentais parecem explicar as taxas de prevalências observadas entre crianças de 0-12 meses de vida e de 19-24 meses. As mais jovens se infectam menos, porém, ocorre um aumento substancial durante o segundo e terceiro anos de vida, o que corrobora com os dados desta pesquisa.⁽²¹⁻²³⁾

A frequência de enteroparasitoses encontrada nos escolares de São João da Boa Vista (19,4%) e a ausência de casos de poliparasitismo revelou-se baixa quando comparada a estudos feitos em outros municípios no Brasil, principalmente na população de 0-6 anos.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

As possíveis razões para essa baixa prevalência pode ser devido ao número de amostras de fezes utilizadas para cada criança e, também, ao perfil socioeconômico das famílias. Todavia, outros estudos, considerando crianças na faixa etária compreendida entre os 0 e 6 anos de idade, demonstram resultados semelhantes aos observados nesta pesquisa.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

Embora os protozoários comensais não sejam patogênicos, a ocorrência desse tipo de organismo reforça a ideia da necessidade de maiores investimentos sanitários, em virtude dos mecanismos de transmissão de alguns parasitos serem semelhantes aos mecanismos daqueles aqui encontrados. Além disso, esses protozoários podem ser indicativos das condições de higiene e vícios de comportamento a que os indivíduos estão expostos, influenciando diretamente na epidemiologia das parasitoses.⁽¹⁰⁾

O presente trabalho, em virtude da inexistência de dados anteriores na região, serve como contribuição ao estudo de parasitoses em escolares e como parâmetro de comparação para estudos posteriores.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Luiza Helena Martins Minghini, professores e demais funcionários da Casa da Criança de São João da Boa Vista, à Ana Cláudia Bastos Varzim Mesquita do Laboratório Labaclini e toda a comunidade por sua colaboração na realização deste trabalho.

Abstract

Objective: In this study was evaluated the occurrence of intestinal parasites in students from São João da Boa Vista, Brazil. **Methods:** A total of 67 samples of faeces were collected and examined, from March to August 2013, according to Hoffman, Pons & Janer, Willis and Rugai, Mattos & Brisola methods. **Results:** The overall prevalence rate was 19.4%. Helminthiasis were not observed and *Giardia duodenalis* was the unique protozoan parasite verified. **Conclusion:** We concluded that the prevalence of intestinal parasites for this group is lower than expected. These results should be a consequence of socioeconomic and sanitary conditions in which they live.

Keywords

Health Public Policy; Disease prevention; Parasites

REFERÊNCIAS

1. Kunz JMO, Vieira AS, Varvakis T, Gomes GA, Rosseto AL, Bernardini OJ, et al. Parasitas Intestinais em Crianças de Escola Municipal de Florianópolis, SC - educação ambiental e em saúde. *Biotemas*. 2008;21(4):157-62.
2. Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JN, Freitas FLC. Enteroparasitoses em crianças de creches de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Rev Pat Trop*. 2009;38(1):35-43.
3. Belinelo VJ, Milaneze BA, Rosa AB, Bussular JPB, Moraes AN, Vieira-Filho SA, et al. Intestinal parasites in students 10 to 15 years of School of São Mateus's periphery, ES, Brazil. *Eur J Sci Res*. 2011;53(2):171-8.
4. Oliveira UD, Chiuchetta SJR. Ocorrência de enteroparasitoses na população do Município de Goioerê-PR. *Estud Biol*. 2009;31(73/74/75):81-5.
5. Barros AJD, Halpern R, Menegon OE. Creches públicas e privadas em Pelotas, RS: aderência à norma técnica. *J Ped*. 1998;74:397-403.
6. Gurgel RQ, Santos LN, Cardoso GS, Oliveira RCV, Silva AM. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracaju, SE. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3): 267-9.
7. Fuchs SC, Maynard RC, Costa LF, Cardozo A, Schierholt R. Duration of day-care attendance and acute respiratory infection. *Cad Saúde Pùb*. 1996;12:291-6.
8. Gracie A, Oliveira M, Póvoa HCC. Perfil de enteroparasitoses infantis no município de Muriaé. *Rev Cient. FAMINAS*. 2006;2(1), Sup. 1: 42.
9. Pittner E, Moraes IF, Sanches HF, Trincaus MR, Raimondo ML, Monteiro MC. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade na cidade de Guarapuava - PR. *Rev Salus*. 2007;1(1):97-100.
10. Macedo HS. Prevalência de Parasitos e Comensais Intestinais em Crianças de Escolas da Rede Pública Municipal de Paracatu (MG). *Rev Bras Anál Clín*. 2005;37(4):209-13.
11. Chaves SME, Vazquez L, Lopes K, Flores J, Oliveira L, Rizzi L, et al. Levantamento de Protozooses e Verminoses nas sete creches municipais de Uruguaiana, Rio Grande do Sul - Brasil. *Rev Bras Anál Clín*. 2006;38(1):39-41.
12. Ferreira UM, Ferreira CS, Monteiro CA. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúde Pùb*. São Paulo. 2000;34:73-82.
13. Torres DM, Chieffi PP, Costa WA, Kudzielics E. Giardíase em creches mantidas pela prefeitura de São Paulo, 1982/83. *Rev Inst Med Trop*. São Paulo. 1991;33(2):137-42.
14. Baptista SC, Breguez JMM, Baptista MCP, Silva GMS, Pinheiro RO. Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ. *Rev Bras Anal Clín*. 2006;38(4):271-3.
15. Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995;28:25-31.
16. Mamus CNC, Moitinho ACC, Grube CC, Melo EM, Weiler EB, Abreu CA, et al. Enteroparasitoses em um Centro Educacional Infantil do Município de Iretama/PR. *SaBios: Rev Saúde e Biol*. 2008;3(2): 39-44.
17. Uchôa CMA, Lobo AGB, Bastos OMP, Matos AD. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro-Brasil. *Rev Inst. Adolfo Lutz*. 2001;60(2): 97-101.
18. Gioia I. Frequência de parasitoses intestinais entre os usuários do centro de saúde do distrito de Sosas, Campinas, SP (1986-1990). *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992;25:177-82.
19. Ludwig KM, Frei F, Alvares FF, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(5):1-12.
20. Tashima NT, Simões MJS. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Westem São Paulo-UNOESTE clinical laboratory, Presidente Prudente, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. São Paulo. 2004;46(5):243-8.
21. Black RE, Dukes AC, Sinclair SRW, Welis JG. Giardiasis in day-care centers: evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics*. 1977;60(4):486-91.
22. Thompson SC. Giardia lamblia in children and the child care setting: a review of the literature. *J Paediat Child Health*. 1994;30(3):202-9.
23. Biscegli TS, Romera J, Candido AB, Santos JM, Candido ECA, Binotto AL. Estado nutricional e prevalência de enteroparasitoses em crianças matriculadas em creche. *Rev Paul Pediatr*. 2009;27(3):289-95.
24. Batista T, Trevisol FS, Trevisol DJ. Parasitoses intestinais em pré-escolares matriculados em creche filantrópica no sul de Santa Catarina. *Arq Catarin Med*. 2009;38(3):39-45.
25. Franco RMB. Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(5):423-4.

Correspondência

Eliana Anunciato Franco de Camargo
 Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia,
 Universidade Estadual de Campinas
 Rua Monteiro Lobato, 255
 13083-862 – Campinas, SP, Brasil

Avaliação parasitológica de alfaces (*lactuca sativa*) comercializadas em restaurantes, supermercados, hortas e feira de Redenção, PA

Parasitological evaluation of lettuces (*lactuca sativa*) marketed in restaurants, supermarkets, gardens and fair of Redenção, PA

Juliete Aparecida dos Santos Queiroz¹

Thuanne Costa Torres²

Alessandro Barbosa dos Reis²

Aline Pinto de Lima²

Ceila Mendonça Alves²

Resumo

As hortaliças, especialmente as consumidas cruas, têm especial importância na transmissão de parasitos intestinais, pois são amplamente utilizadas pela população e podem conter cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos. Considerando esta hipótese, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de enteroparasitos em alface (*Lactuca sativa*) comercializada no município de Redenção, Pará, Brasil. As amostras foram coletadas aleatoriamente em diferentes locais de comércio, sendo eles: supermercados, feira livre, hortas e restaurantes. O material foi processado segundo a técnica descrita por Borges & Oliveira.⁽¹⁾ Todas as 112 amostras de alface foram submetidas às técnicas parasitológicas de Faust et al.⁽²⁾ e Hoffman, Pons e Janer⁽³⁾ modificado por Borges & Oliveira.⁽¹⁾ A prevalência global foi de 59,82% (n=67), onde o encontro de protozoários foi mais frequente do que o de helmintos, sendo a *Entamoeba histolytica* e a *Giardia lamblia* os protozoários mais presentes. Quanto aos locais de procedência, a feira livre destacou-se com 77,5% das contaminações. Considerando os resultados, ressalta-se a importância de medidas preventivas na produção, comercialização e consumo dessa hortaliça, que devem ser implementadas pela Vigilância Sanitária, produtores e também pelos consumidores.

Palavras-chave

Alface; Contaminação; Parasitos

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais representam um sério problema de saúde pública no Brasil, pois possuem uma elevada prevalência e uma grande variação de manifestação clínica, e estão diretamente relacionadas com as baixas condições de saneamento básico e educação sanitária.⁽⁴⁻⁶⁾ O Brasil, como um país tropical em desenvolvimento, possui clima e situação socioeconômica favorável para as doenças parasitárias, tanto nas áreas rurais quanto nas urbanas.^(5,7,8)

Essas doenças afetam o homem quando os parasitos instalam-se e crescem nos tecidos humanos e passam a se alimentar à custa dos mesmos.⁽⁹⁾ O indivíduo pode apresentar sintomas como diarreia, perda de peso, anemia, desnutrição, cólicas, insônia, agitação, sintomas relacionados ao sistema nervoso, desenvolvimento físico e mental lento e, em alguns casos, pode levar ao óbito.⁽¹⁰⁾ Entretanto, muitas vezes as enteroparasitoses são esquecidas, pois seus sintomas são confundidos com os de outras doenças ou são inespecíficos, ficando os indivíduos parasitados por longos anos de forma silenciosa e inaparente.⁽⁶⁾

Os parasitos são divididos em duas classes, os protozoários (cistos e trofozoítos) e os helmintos (ovos e larvas). Dentre os protozoários mais preocupantes para a saúde pública estão a *Giardia lamblia* que é considerado o protozoário que mais afeta o homem, podendo causar grave desnutrição, e a *Entamoeba histolytica*, protozoário que mais mata no mundo por causar lesões intestinais. Já entre os helmintos se destacam o *Ascaris lumbricoides* e o *Strongyloides stercoralis* que podem provocar lesões hepáticas e pulmonares.⁽¹⁰⁾

A transmissão desses parasitos ocorre principalmente através de moscas, pelo solo, pela veiculação hídrica, pelas mãos e depósitos subungueais em manipuladores de alimentos com maus hábitos higiênicos, e também por verduras e alimentos mal lavados ou em condições precárias de higiene.⁽¹¹⁾ As hortaliças, especialmente as consumidas cruas, têm especial importância na transmissão de parasitos intestinais, pois são amplamente consumidas pela população e podem conter cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos.^(12,13)

De acordo com estudos de Souza et al.⁽¹⁴⁾ e Takayanagi et al.,⁽¹⁵⁾ a contaminação de hortaliças pode ser resultante da

¹Biomédico. Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida, FESAR – Redenção, PA.

²Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida, FESAR – Redenção, PA.

utilização de água infectada com material fecal ou de adubos com dejetos de animais, às vezes contendo fezes de seres humanos, podendo também ser contaminada no transporte ou pontos de vendas ou pelas sucessivas manipulações. Além disso, em muitas cidades brasileiras não há tratamento de esgoto e isto tem feito com que o uso da água dos rios para a lavagem de hortaliças, que na maioria das vezes são consumidas *in natura*, também seja causa da transmissão de parasitos patogênicos que causam problemas de saúde pública.^(16,17)

Dentre as diversas hortaliças que podem transmitir parasitos ao homem, a alface (*Lactuca sativa*) aparece em diversos estudos realizados no Brasil com altos índices de contaminação por helmintos e protozoários. No estudo de Vollkopf, Lopes & Navarro,⁽¹⁸⁾ em Porto Murinho, MS, os autores evidenciaram 91,50% de contaminação. Falavigna et al.,⁽¹⁹⁾ por sua vez, em pesquisa na região Noroeste do Paraná, mostraram resultado de 74%; Ono et al.⁽⁴⁾ registraram 38% em Guarapuava, PR e Oliveira & Germano,⁽¹²⁾ em pesquisa de protozoário feita na região metropolitana de São Paulo, SP, registraram 26% de contaminação.

Por Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) Nº 12 de 1978, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determina que as hortaliças para consumo humano não devem conter sujidades e parasitos.⁽²⁰⁾ Ressalta-se também que esta hortaliça, quando consumida crua, possui diversas propriedades nutritivas,⁽²¹⁾ com importantes fontes de sais minerais, principalmente cálcio e vitaminas, em especial a vitamina A.⁽²²⁾ Nesse sentido, torna-se relevante a execução de pesquisas que visem conhecer o grau de contaminação dessa hortaliça com vistas a reforçar a importância da população em inserir bons hábitos na manipulação dos alimentos bem como para subsidiar a gestão municipal no desenvolvimento de projetos voltados à melhoria das ações de saúde pública, em especial no que concerne ao combate das enteroparasitoses.

Assim, considerando que o município de Redenção, PA não dispõe de rede de esgoto e tratamento de água e partindo da hipótese de que ele não difere dos outros estudos onde foram constatados elevados índices de contaminação por enteroparasitos em amostras de alfaces, esta pesquisa tem como objetivo avaliar parasitologicamente amostras de alfaces comercializadas no município para verificar se apresentam algum tipo de contaminação por protozoários ou helmintos que podem causar parasitoses intestinais no homem.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, com abordagem quantitativa, em que amostras de alface (*Lactuca sativa*) foram coletadas em diversos pontos de comercialização e submetidas a dois tipos de testes parasitológicos para a verificação da presença ou não de enteroparasitos.

A coleta e a análise das amostras ocorreram no período de 16 de maio a 27 de junho de 2012, em 14 pontos de comercialização de hortaliças, sendo quatro supermercados, uma feira livre (cinco bancas), três hortas e dois restaurantes. Em cada ponto de comercialização foram coletadas, aleatoriamente, duas amostras de alface do tipo “crespa” em quatro semanas seguidas, totalizando 112 amostras. As hortaliças foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos e levadas ao laboratório de parasitologia da Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida (Fesar) para análise.

O preparo das amostras foi realizado segundo a técnica descrita por Borges & Oliveira.⁽¹⁾ Foram utilizados pés de alface inteiros, independentemente do peso ou tamanho, nos quais as folhas foram separadas uma a uma, descartando-se as manchadas ou deterioradas, bem como o talo. As folhas das alfaces foram colocadas em uma bacia plástica, para a realização da lavagem com uma solução de lauril sulfato de sódio a 1%, utilizando-se, para isso, um pincel, o qual foi passado em todas as superfícies das folhas para a retirada dos ovos e larvas dos parasitos. Depois de lavadas, as hortaliças foram descartadas e o produto da lavagem foi utilizado para a análise parasitológica, pelos métodos de Hoffman, Pons e Janer (HPJ)⁽³⁾ modificado por Borges & Oliveira⁽¹⁾ e o de Faust et al.⁽²⁾

A análise pelo método de HPJ foi realizada por meio da técnica de sedimentação por centrifugação a 2.500 rpm por cinco minutos. Foram retirados aproximadamente 8 mL de sedimentos com auxílio de uma pipeta, adicionados em tubos de ensaios e centrifugados. Logo após, foi retirada uma gota do sedimento e transferida para uma lâmina. Em seguida, a lâmina foi corada com lugol, coberta por uma lamínula e analisada no microscópio óptico com aumento de 10x e, posteriormente, de 40x para pesquisa de protozoários e helmintos.

A análise pelo método de Faust et al.⁽²⁾ foi realizada por meio da técnica de centrifugo-flutuação com a solução de zinco a 33%, centrifugado por um minuto, a 2.500 rpm. Após a realização da técnica, foi retirada uma parte do sobrenadante com uma alça de inoculação e colocada na lâmina juntamente com lugol; em seguida, foi coberta por uma lamínula e levada ao microscópio óptico, com aumento de 40x, para a pesquisa de protozoários leves. Para os dois testes, foram feitas três lâminas de cada amostra analisada.⁽²³⁾

Após as análises parasitológicas, os resultados foram registrados em ficha individual pautada. Cada ficha continha o código da amostra, a data da coleta, a data da análise e os respectivos resultados. Os dados foram organizados no programa Microsoft Office Excel versão 2007 e os resultados demonstrados em porcentagens. A discussão dos resultados apoiou-se em diversos estudos da literatura nacional, que utilizaram métodos de análise parasitológicas semelhantes ou iguais ao realizado no presente estudo.

RESULTADOS

Das 112 amostras de alface coletadas em estabelecimentos comerciais de Redenção, PA, 67 (59,82%) apresentaram algum tipo de contaminação e 45 (40,18%) foram negativas.

O índice de contaminação de acordo com o estabelecimento de procedência da amostra evidenciou que a feira livre foi o local em que mais houve contaminação (77,50%), seguido pelas hortas (75,00%) e supermercados (56,25%). Nos restaurantes, onde a hortaliça está disponível para o consumo imediato, não foi encontrado contaminação.

Das 67 amostras positivas, em 27 (40,30%) foram identificadas espécies parasitárias de modo isolado, sendo

que as estruturas que se apresentaram com maior frequência foram a *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, ambas com oito amostras positivas (11,95%), conforme demonstra a Tabela 1.

Em quase 60% das amostras contaminadas foram encontradas mais de um parasito, sendo que em 35 (52,24%) foi observado biparasitismo (duas espécies de parasito em uma amostra) e em cinco amostras (7,46%) foi verificado poliparasitismo, ou seja, mais de duas espécies de parasito em uma amostra.

O caso de biparasitismo mais prevalente foi a associação entre as espécies *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*; no poliparasitismo, as espécies *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e *Endolimax nana*. Os demais achados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1- Enteroparasitos encontrados em amostras de alfaces (n=67), analisadas pela técnica descrita por Borges & Oliveira⁽¹⁾ coletadas em diversos estabelecimentos do município de Redenção - Pará, 2012

Espécies de Enteroparasitos	Nº Amostra Positiva	%
Cisto de <i>Entamoeba coli</i>	07	10,44
Cisto de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	08	11,95
Cisto de <i>Endolimax nana</i>	01	1,49
Cisto de <i>Giardia lamblia</i>	08	11,95
Cisto de <i>Balantidium coli</i>	01	1,49
Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i>	02	2,98
Biparasitismo	35	52,24
Poliparasitismo	05	7,46
TOTAL	67	100

Tabela 2 - Casos de biparasitismo e poliparasitismo em amostras de alface comercializadas no município de Redenção - Pará, 2012

Espécies de Enteroparasitos	Nº Amostra Positiva	%
Biparasitismo		
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> e <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	08	20,00
Cistos de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Giardia lamblia</i>	05	12,50
Cistos de <i>Endolimax nana</i> e <i>Giardia lamblia</i>	05	12,50
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> e <i>Giardia lamblia</i>	05	12,50
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> e <i>Endolimax nana</i>	05	12,50
Cistos de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Endolimax nana</i>	02	5,00
Cisto de <i>Giardia lamblia</i> e Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i>	02	5,00
Cistos de <i>Endolimax nana</i> e <i>Balantidium coli</i>	01	2,50
Cistos de <i>Endolimax nana</i> e Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i>	01	2,50
Cisto de <i>Entamoeba coli</i> e Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i>	01	2,50
Poliparasitismo		
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Endolimax nana</i>	03	7,50
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> , <i>Entamoeba Histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Endolimax nana</i>	01	2,50
Cistos de <i>Entamoeba coli</i> , <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e Ovo de <i>Ascaris</i>	01	2,50
Lumbricoides		
TOTAL	40	100

O método que apresentou uma maior positividade de enteroparasitos pesquisado na alface foi o método HPJ⁽³⁾ modificado por Borges & Oliveira⁽¹⁾ realizados através de sedimentação por centrifugação, que apresentou 58 (51,79%) das amostras positivas. O método de Faust, por sua vez, evidenciou apenas 30 (26,78%) das amostras positivas.

DISCUSSÃO

O índice de contaminação nas amostras de alface, no presente estudo, foi de 59,82%, o que não diferiu de outros municípios brasileiros, tal como evidenciou o estudo de Falavigna et al.,⁽¹⁹⁾ no noroeste do Paraná, em que foi encontrado um índice de 74%, e outro realizado em Florianópolis-SC, em que se relatou um percentual de 60%.⁽²⁴⁾ Em outros municípios, no entanto, os índices de contaminação da alface por protozoários ou helmintos não ultrapassaram 35%.^(25,26) Verificou-se, portanto, que o município de Redenção, PA encontra-se em um nível intermediário frente a outras cidades brasileiras, resultado este que está diretamente ligado à deficiência de condições higiênico-sanitárias no cultivo e manipulação dessas hortaliças.

Com relação ao local de procedência, houve um maior índice de contaminação na feira livre (77,50%), corroborando com os resultados encontrados em diversos estudos brasileiros, em que este índice também foi superior a 50%.^(18,19,27-29) Muitas vezes, nestes locais, as hortaliças são transportadas e armazenadas de forma inadequada, passam muito tempo expostas à venda, são molhadas repetidas vezes para mantê-las conservadas e frescas com água não tratada, fatores que facilitam a contaminação.

Com relação às hortas, estudos como de Melo et al.⁽³⁰⁾ e de Vollkopf, Lopes & Navarro,⁽¹⁸⁾ que encontraram índices, respectivamente, de 75% e 100% de contaminação, foram coerentes com o encontrado neste estudo. Os altos índices de contaminação encontrados nas hortas podem ser devido à água contaminada utilizada na irrigação e no cultivo, o adubo contendo material fecal de humano e/ou animal, o contato direto de animais como aves, moscas, ratos e cães com as hortaliças e a forma inadequada como elas são manuseadas.

Nos supermercados, os índices foram equivalentes aos encontrados nos estudos de Soares & Cantos (60%)⁽²⁴⁾ e Freitas et al. (56%).⁽²⁹⁾ O resultado do presente estudo nesses estabelecimentos, apesar de baixos, quando comparados aos da feira livre e hortas, são preocupantes, pois os mesmos recebem fiscalização da vigilância sanitária, devendo, por isso, ter índices bem menores. Isto sugere que, em algum momento, seja na manipulação, no transporte, no armazenamento ou na comercialização, as hortaliças estejam sendo contaminadas nesses locais e os órgãos de fiscalização não conseguiram detectar..

As amostras analisadas nos restaurantes do município de Redenção-PA não apresentaram nenhuma contaminação, diferindo dos estudos de Parteli & Gonçalves⁽²⁵⁾ e de

Montanher, Coradin & Silva,⁽³¹⁾ em que foram encontrados 12,5% e 10% de amostras positivas, respectivamente. Este achado demonstra que o processo de manipulação (seleção e lavagem) dessa hortaliça nos restaurantes participantes desta pesquisa está sendo feito adequadamente.

Entre as formas parasitárias encontradas no presente estudo obteve-se uma maior prevalência de protozoários sobre helmintos, sendo a *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e a *Giardia lamblia* os protozoários mais presentes nas amostras, seguido pela *Entamoeba coli*. Estes achados foram condizentes com os estudos de Oliveira & Germano,⁽¹²⁾ Takayanagi et al.⁽³²⁾ e Osaki et al.,⁽²⁶⁾ onde também houve prevalência dessas espécies de protozoários.

A *Entamoeba histolytica* e a *Giardia lamblia* são consideradas como os principais protozoários que causam patologias em todo o mundo, além de representarem contaminação fecal de origem humana e/ou animal.⁽¹⁰⁾

Embora a *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e o *Balantidium coli* sejam considerados organismos não patogênicos, as taxas encontradas são importantes, pois indicam que a alface está exposta à contaminação fecal. Observa-se, assim, que a contaminação das amostras por algum desses protozoários está relacionada com condições sanitárias e práticas de cultivo inadequadas.

Entre os helmintos encontrados nas amostras analisadas neste estudo, destacou-se o *Strongyloides stercoralis* (2,98%). No entanto, o índice encontrado foi inferior a outras pesquisas realizadas no contexto nacional.^(4,13,24) O baixo índice encontrado em Redenção, PA pode estar relacionado com o ciclo biológico desse helminto, que necessita de solo arenoso, umidade alta, temperatura baixa e ausência de luz solar,⁽²³⁾ sendo que, em nossa região, as características geográficas não propiciam o seu ciclo no solo.

Os casos de biparasitismo e poliparasitismo encontrados nesta pesquisa foram preocupantes, porém, poucos estudos evidenciam a frequência de mais de uma espécie de parasito em amostras de alface. Osaki et al.⁽²⁶⁾ apenas revelaram que, das 52 touceiras de alface avaliadas, 18 (34,6%) apresentaram uma ou mais estruturas parasitárias como oocistos ou cistos de protozoários e ovos de helmintos, sem especificá-los. Já Saraiva et al.⁽³³⁾ evidenciaram que 50% das amostras analisadas estavam contaminadas com mais de um parasito. No estudo de Frias, Silva & Tozato,⁽³⁴⁾ realizado com amostras de almeirão e agrião, os autores também encontraram poliparasitismo em 50% delas.

Neste estudo, os parasitos que mais se destacaram no biparasitismo foram *Entamoeba coli* com *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (20,00%), seguido de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* com *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* com *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* com *Giardia lamblia* e *Entamoeba coli* com *Endolimax nana*, todos com uma positividade de 12,50%. No poliparasitismo, os que mais se destacaram foram os cistos de *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e *Endolimax nana* (7,50%), ficando assim evidenciado que está havendo uma

contaminação fecal. No biparasitismo e no poliparasitismo também ficou evidente que, dos 40 casos, foram encontrados 35 em que havia alguma espécie parasitária considerada como patogênica.

Considerando a alta frequência de contaminação fecal e o elevado risco de doenças causadas pelos parasitos intestinais patogênicos, torna-se necessário o fortalecimento do sistema de Vigilância Sanitária para fiscalização de alimentos bem como a criação de programas educativos sobre os preceitos básicos de higiene pessoal aos produtores e manipuladores de alimentos e sobre a importância da lavagem correta das hortaliças antes do consumo. Quanto a isto, Melo et al.,⁽²²⁾ em publicação para a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), recomendam a lavagem das folhas uma a uma em água corrente, e depois a imersão em solução de água sanitária (1 colher de sopa para 1 litro de água filtrada) por 30 minutos, seguido do enxágue com água filtrada.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, considera-se que as hortaliças comercializadas em feiras, hortas e supermercados do município de Redenção, PA representam fontes importantes de transmissão das enteroparasitoses. Ressalta-se assim, a importância de medidas preventivas na produção, comercialização e consumo dessa hortaliça, que devem ser implementadas pela Vigilância Sanitária, produtores e pelos próprios consumidores.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dr^a orientadora Aline Pinto de Lima, e a Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida que nos disponibilizou o laboratório para análise da pesquisa.

Abstract

*The vegetables, especially consumed the raw, has special importance in the transmission of intestinal parasites, they are widely consumed by the population and may contain protozoan cysts, helminth eggs and larvae. Considering this hypothesis the present work was objective to evaluate the occurrence of intestinal parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) market in the municipality of Redemption, Pará, Brazil. The samples were collected randomly in different places of commerce, being they: supermarkets, free fair, gardens and restaurants. The material was processed second technique described by Borges & Oliveira.⁽¹⁾ All 112 samples of lettuce that were submitted to parasitological techniques of Faust et al.⁽²⁾ (1938) e Hoffman, Pons e Janer (1934)⁽³⁾ modification by Borges & Oliveira (2012).⁽¹⁾ The overall prevalence was 59.82% (n = 67), being *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* the protozoa more gifts. As for the place of provenance the free fair stood out with 77.5% contamination. Considering the results, it is noteworthy the importance of preventive measures in the production, marketing and consumption of this vegetable, which must be implemented by the Health Surveillance, producers and by consumers.*

Keywords

Lettuce; Contamination; Parasites

REFERÊNCIAS

1. Borges DO, Oliveira CGA. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) hidropônicas comercializadas nos municípios de Bom Jesus do Itabapoama e Itaperuna/RJ. Rev. Laes & Haes. 2012;1(195):100-14.
2. Faust EC, D'Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Salwitz W, et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. Am J Trop Med. 1938;18:169-83.
3. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis mansoni. Puerto Rico J Public Health. 1934;9:281-98.
4. Ono LM, Zulpo DL, Peretti J, Garcia JL. Ocorrência de helmintos e protozoários em hortaliças cruas comercializadas no município de Guarapuava, Paraná Brasil. Semina: Ciência Agrárias. 2005; 26(4):543-6.
5. Quadros RM, Marques SMT, Favaro DA, Pessoa VB, Arruda AAR, Santini J. Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages - Santa Catarina. Revista Ciência & Saúde. 2008;1(2):78-84.
6. Araujo CF, Fernández CL. Incidência de enteroparasitoses em localidades atendidas pelo comando da aeronáutica no estado do Amazonas. RMA. 2005;55(1/2):40-6.
7. Simões M, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini M H, Chiarini PFT, Antunes JLF, Nogueira AP. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. Braz J Microbiol. 2001; 32(4):331-3.
8. Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. Parasitol Latinoam. 2005;60(1/2):78-81.
9. Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 1a ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1999, 375 p.
10. Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RW A. Parasitologia humana. 11a ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2005, 494 p.
11. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1379-93.
12. Oliveira CAF, Germano PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I - Pesquisa de protozoários intestinais. Rev. Saúde Públ. 1992;26(4):283-9.
13. Oliveira CAF, Germano PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. II - Pesquisa de protozoários intestinais. Rev. Saúde Públ. 1992;26(5):332-5.
14. Souza FR, Oliveira SL, Mariano SG, Silva ER, Braga CAB, Duque RG. Avaliação da contaminação parasitária das hortaliças in natura comercializadas em feiras livres e supermercados da cidade de Jataí - GO. In: Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG, 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006.
15. Takayanagui OM, Febrônio LHP, Bergamini AM, Okino MHT, Silva A AMCC, Santiago R, Capuano DM, Oliveira MA, Takayanagui AM M. Fiscalização de hortas produtoras no município de Ribeirão Preto, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(2):169-74.
16. Marzochi MCA. Estudo dos Fatores na Disseminação dos Enteroparasitas. II - Estudo da Contaminação de Verduras e Solo de Hortas na Cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop. 1977;19(3):148-55.
17. Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AM, Capuano DM, Okino MHT, Febrônio LHP, Silva AAMCC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AM. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34(1):37-41.

18. Vollkopf PCP, Lopes FMR, Navarro IT. Ocorrência de enteroparasitos em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Porto Murtinho - MS. Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR. 2006;9(1): 37-40.
19. Falavigna LM, Freitas CBR, Melo GC, Nishi L, Araújo SM, Guilherme ALF. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. Parasitol Latinoam. 2005;60(3):144-9.
20. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral Alimentos. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. D.O. de 24/07/1978. [capturado em 2008 Ago 25]; Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_hortalicas.htm. Acesso em 28 de setembro de 2012.
21. Andrade Junior AS, Klar AE. Manejo da irrigação da cultura da alface (*Lactuca Sativa* L.) através do tanque classe A. Scientia Agricola. 1997;54(1/2):31-8.
22. Melo MF, Moreira LM, Santos FF, Luengo RFA, Matos MJLF, Tavares, SA. Alface. Disponível em: <www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/alface.htm>. Acesso em 19 mar. 2012.
23. Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia humana, 12a ed. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 2011, 546 p.
24. Soares B, Cantos GA. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. Rev Bras Cienc Farm. 2006;42(3):455-60.
25. Parteli DP, Gonçalves SA. Pesquisa de Parasitas Intestinais em Folhas de Alfaces (*Lactuca Sativa* L.) comercializadas no Município de Vitória-Es. 2005. 31 p. Graduação em Farmácia e Bioquímica - Faculdade Brasileira UNIVIX. Espírito Santo.
26. Osaki SC, Moura AB, Zulpo DL, Calderon FF. Enteroparasitas em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Guarapuava (PR). *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*. 2010;6(1):89-96.
27. Alves EGL, Guimarães AM, Figueiredo HCP, Costa GM. Parasitos intestinais em hortaliças comercializadas em Lavras, Minas Gerais. 2002. 2 p. Graduação em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.
28. Rocha A, Mendes RA, Barbosa CS. Strongyloides spp e outros parasitos encontrados em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializados na cidade do Recife, PE. *Rev Patol Trop*. 2008;37(2): 151-60.
29. Freitas AA, Kwiatkowski A, Nunes SC, Simonelli SM, Sangioni LA. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 2004;26(4):381-4.
30. Melo ACFL, Furtado LFV, Ferro TC, Bezerra KC, Costa DCA, Costa LA, Silva LR. Contaminação parasitária de alfaces e sua relação com enteroparasitoses em manipuladores de alimentos. *R Trop Ci Agr Biol*. 2011;5(3):47-52.
31. Montanher CC, Coradin DC, Silva SEF. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca Sativa*) comercializadas em restaurantes self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. *Estud. Biol*. 2007;29(66):63-71.
32. Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CAD, Bergamini AMM, Okino MHT, Silva AAMCC, et al. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):239-41.
33. Saraiva N, Ballester LGB, Povêa AM, Anibal FF. Incidência da contaminação parasitária em alfaces nos municípios de Araraquara (SP) e São Carlos (SP). *Revista Uniara*. 2005;16(1):213-8.
34. Frias AAT, Silva JB, Tozato HC. Ocorrência de ovos de helmintos em hortaliças comercializadas na cidade de Apucarana (PR). *Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012;33(1):35-42.

Correspondência

Juliete Aparecida dos Santos Queiroz

Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida (FESAR)

Av. Brasil nº1435 - Alto Paraná

68550-325 - Redenção, PA

julieteveras22@hotmail.com